

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

10.08.079  
04-5-06 (19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
20. November 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/095655 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82

(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; BASF Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/04711

(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. Mai 2003 (06.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 20 753.4 8. Mai 2002 (08.05.2002) DE  
102 26 413.9 13. Juni 2002 (13.06.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056  
Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RENZ, Andreas  
[DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str.6, 67117 Limburgerhof  
(DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str.56,  
67063 Ludwigshafen (DE). STITT NIGEL, Marc  
[GB/DE]; Grosse Weinmeisterstr. 22a, 14469 Potsdam  
(DE). ZRENNER, Rita, Maria [DE/DE]; Storchenhof 6,  
14476 Golm (DE). GEIGENBERGER, Peter [DE/DE];  
Quantzstr. 12, 14129 Berlin (DE). VIGEOLAS, Helene  
[FR/DE]; Am alten Mörtelwerk 14, 14469 Potsdam (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHODS FOR INCREASING OIL CONTENT IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERHÖHEN DES ÖLGEHALTES IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for increasing the oil content in plants, preferably in the seeds of plants, by expres-  
sion of glycerol-3-phosphatdehydrogenases (G3PDH) from yeast, preferably from *Saccharomyces cerevisiae*. The invention also  
relates to expression constructs for the expression of G3PDH yeast in plants, preferably in the seeds of plants, transgenic plants  
expressing G3PDH, and to the use of said transgenic plants in the production of foodstuffs, feed, seeds, pharmaceuticals or fine  
chemicals, especially in the production of oils.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Sa-  
men, durch Expression von Glycerol-3-phosphatdehydrogenasen (G3PDH) aus Hefen, bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*.  
Die Erfindung betrifft ferner Expressionskonstrukte zur Expression von Hefe G3PDH in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen,  
transgene Pflanzen exprimierend Hefe G3PDH, sowie die Verwendung von besagter transgener Pflanzen zur Herstellung von Nah-  
rungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere zur Herstellung von Ölen.

WO 03/095655 A2

## Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen

## Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, durch Expression von Glycerol-3-phosphatdehydrogenasen (G3PDH) aus Hefen, bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erfindung betrifft ferner

- 10 Expressionskonstrukte zur Expression von Hefe G3PDH in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, transgene Pflanzen exprimierend Hefe G3PDH, sowie die Verwendung von besagter transgener Pflanzen zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere zur Herstellung von
- 15 Ölen.

Die Erhöhung des Ölgehalts in Pflanzen und insbesondere in Pflanzensamen ist für die klassische wie für die modernen Pflanzenzüchtung und insbesondere die pflanzliche Biotechnologie

- 20 von großem Interessen. Bedingt durch den steigenden Verbrauch von Pflanzenölen für Ernährung bzw. industrielle Anwendungen sind Möglichkeiten zur Steigerung bzw. Modifikation von Pflanzenölen zunehmend Gegenstand aktueller Forschung (z.B. Töpfer et al. (1995) *Science* 268:681-686). Ziel ist dabei insbesondere die
- 25 Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren in Samenölen.

Auch die aus den pflanzlichen Ölen erhältlichen Fettsäuren sind von besonderem Interesse. Sie kommen beispielsweise als Grundstoffe für Weichmacher, Schmierstoffe, Tenside, Kosmetika usw.

- 30 zum Einsatz oder werden in der Lebens- und Futtermittelindustrie als wertvoll Grundstoffe eingesetzt. So ist beispielsweise die Bereitstellung von Rapsölen mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge von besonderem Interesse, da diese besonderes in der Tensidherstellung begehrt sind.

35

Durch die gezielte Modulation pflanzlicher Stoffwechselwege mittels gentechnische Verfahren kann der pflanzlichen Metabolismus in einer Weise vorteilhaft verändert werden, die durch klassische Züchtungsmethoden nur über langwierige Schritte bzw.

- 40 überhaupt nicht zu erreichen wären. So werden ungewöhnliche Fettsäuren, beispielsweise bestimmte polyungesättigte Fettsäuren, nur in bestimmten Pflanzen bzw. überhaupt nicht in Pflanzen synthetisiert und können deshalb nur durch Expression des entsprechenden Enzyms in transgenen Pflanzen hergestellt werden
- 45 (z.B. Millar et al. (2000) *Trends Plant Sci* 5:95-101).

## 2

Triacylglyceride und andere Lipide werden aus Fettsäuren synthetisiert. Die Fettsäure- und Triacylglyceridbiosynthese lassen sich aufgrund der Kompartimentierung als getrennte Biosynthesewege, jedoch im Hinblick auf das Endprodukt, als ein Biosyntheseweg ansehen. Die Lipidsynthese kann dabei in zwei Teilmechanismen unterteilt werden, einen quasi "prokaryotischen" und einen quasi "eukaryotischen" (Browse et al. (1986) *Biochemical J* 235:25-31; Ohlrogge & Browse (1995) *Plant Cell* 7:957-970). Der prokaryotische Mechanismus ist in den Plastiden lokalisiert und umfasst die Biosynthese der freien Fettsäuren, die in das Cytosol exportiert werden, wo sie als Fettsäureacyl-CoA-Ester in den eukaryotischen Mechanismus eingehen und mit Glycerin-3-phosphat (G3P) zu Phosphatidsäure (PA) verestert werden. PA ist der Ausgangspunkt für die Synthese von neutralen und polaren Lipiden. Die neutralen Lipide werden dabei über den Kennedy-Weg am Endoplasmatischen Reticulum synthetisiert (Voelker (1996) *Genetic Engineering*, Setlow (ed.) 18:111-113; Shankline & Cahoon (1998) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:611-649; Frentzen (1998) *Lipids* 100:161-166). Neben der Biosynthese Triacylglyceriden dient G3P auch der Synthese von Glycerol (z.B. zur Osmoregulation und gegen Kältestress).

Das für die Synthese wesentliche G3P wird dabei durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) mittels der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH), auch als Dihydroxyacetonphosphat-reduktase bezeichnet, synthetisiert. Dabei fungiert in der Regel NADH als reduzierendes Cosubstrat (EC 1.1.1.8). Eine weitere Klasse von Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.5) verwendet FAD als Cosubstrat. Die Enzyme dieser Klasse katalysieren die Reaktion von DHAP zu G3P. In eukaryontischen Zellen sind die beiden Enzymklassen in unterschiedlichen Kompartimenten verteilt, wobei die NAD-abhängigen cytosolisch und die FAD-abhängigen mitochondriell lokalisiert sind (für *Saccharomyces cerevisiae* siehe z.B. Larsson et al., 1998, *Yeast* 14:347-357). EP-A 0 353 049 beschreibt eine NAD-unabhängige G3PDH aus *Bacillus* sp. Auch in *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine NAD-unabhängige G3PDH identifiziert (Miyata K, Nagahisa M (1969) *Plant Cell Physiol* 10(3):635-643).

G3PDH ist ein essentielles Enzym in Prokaryoten und Eukaryoten, das neben der Funktion in der Lipidbiosynthese auch für die Aufrechterhaltung des zellulären Redoxstatus durch den Einfluss auf das NAD<sup>+</sup>/NADH Verhältnis mitverantwortlich ist. Die Deletion des GPD2 Gens in *Saccharomyces cerevisiae* (eine von zwei Isoformen der G3PDH in dieser Hefe) hat ein vermindertes Wachstum unter anaeroben Bedingungen zur Folge. Darüber hinaus scheint die G3PDH eine Rolle in der Stressantwort der Hefe v.a. gegen osmotischen

## 3

Stress zu spielen. Die Deletion des GPD1 Gens bedingt in *Saccharomyces cerevisiae* eine Hypersensitivität gegen Salz.

- Sequenzen für G3PDHs wurden beschrieben für Insekten (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Cuphea lanceolata*), Säugern (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*), Fischen (*Salmo salar*, *Osmerus mordax*), Vögeln (*Ovis aries*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Algen und Bakterien.
- 10 Pflanzliche Zellen weisen mindestens zwei Isoformen der G3PDH auf, eine cytoplasmatische und eine plastidäre (Gee RW et al. (1988) *Plant Physiol* 86:98-103; Gee RW et al. (1988) *Plant Physiol* 87:379-383). Die enzymatische Aktivität der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase wurde bei Pflanzen erstmals in Kartoffelknollen festgestellt (Santora GT et al. (1979) *Arch Biochem Biophys* 196:403-411). Weitere zytosolisch und plastidär lokalisierte G3PDH Aktivitäten wurden in anderen Pflanzen wie Erbse, Mais oder Soja detektiert (Gee RW et al. (1988) *PLANT PHYSIOL* 86(1): 98-103). Beschrieben sind ferner G3PDHs aus Algen wie z.B. zwei plastidäre und einer zytosolische G3PDH-Isoform aus *Dunaliella tertiolecta* (Gee R et al. (1993) *Plant Physiol* 103(1):243-249; Gee R et al. (1989) *PLANT PHYSIOL* 91(1):345-351). Für die pflanzliche G3PDH aus *Cuphea lanceolata* wurde vorgeschlagen, durch Überexpression in Pflanzen eine Erhöhung des Ölgehaltes oder eine Verschiebung im Fettsäuremuster zu erreichen (WO 95/06733). Entsprechende Effekte konnten jedoch nicht belegt werden.

- Bakterielle G3PDHs und ihre Funktion sind beschrieben (Hsu und Fox (1970) *J Bacteriol* 103:410-416; Bell (1974) *J Bacteriol* 117:1065-1076).

- WO 01/21820 beschreibt die heterologe Expression einer mutierten *E. coli* G3PDH für erhöhte Stresstoleranz und Änderung der Fettsäurezusammensetzung in Speicherölen. Die mutierte *E. coli* G3PDH (gpsA2FR) weist einen einzelnen Aminosäureaustausch auf, der eine veränderte Inhibition durch G3P bedingt. Die heterologe Expression der gpsA2FR Mutante führt zu Glycerolipiden mit einem erhöhten Anteil an C16-Fettsäuren und einem einhergehenden verminderten Anteil an C18-Fettsäuren. Die Veränderungen im Fettsäuremuster sind relativ gering: Ein Anstieg von 2 bis 5 % an 16:0 Fettsäuren und 1,5 bis 3,5 % bei 16:3 Fettsäuren, sowie eine Verminderung an 18:2 und 18:3 Fettsäuren um 2 bis 5 % wurde beobachtet. Der Gesamtgehalt an Glycerolipiden blieb
- 45 unbeeinflusst.

Beschrieben sind ferner G3PDH aus Hefen (Ascomyceten) wie

- a) *Schizosaccharomyces pombe* (Pidoux AL et al. (1990) *Nucleic Acids Res* 18 (23): 7145; GenBank Acc.-No.: X56162; Ohmiya R et al. (1995) *Mol Microbiol* 18(5):963-73; GenBank Acc.-No.: D50796, D50797),
  - b) *Yarrowia lipolytica* (GenBank Acc.-No.: AJ250328)
  - 10 c) *Zygosaccharomyces rouxii* (Iwaki T et al. *Yeast* (2001) 18(8):737-44; GenBank Acc.-No.: AB047394, AB047395, AB047397) oder
  - d) *Saccharomyces cerevisiae* (Albertyn J et al. (1994) *Mol Cell Biol* 14(6):4135-44; Albertyn J et al. (1992) *FEBS LETT* 308(2):130-132; Merkel JR et al. (1982) *Anal Biochem* 122 (1):180-185; Wang HT et al. (1994) *J Bacteriol.* 176(22):7091-5; Eriksson P et al. (1995) *Mol Microbiol.* 17(1):95-107; GenBank Acc.-No.: U04621, X76859, Z35169).
  - 20 e) *Emericella nidulans* (GenBank Acc.-No.: AF228340)
  - f) *Debaryomyces hansenii* (GenBank Acc.-No.: AF210060)
  - 25 Es stellte sich daher die Aufgabe alternative Verfahren zur Erhöhung des Ölgehaltes in Pflanzen bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.
- Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zum
- 30 Erhöhen des Gesamtölgehalt in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, umfassend
  - a) transgene Expression einer Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe in besagtem pflanzlichen Organismus oder einem
  - 35 Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben und
  - b) Auswahl von pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - der Gesamtölgehalt in dem besagten pflanzlichen Organismus oder einem
  - 40 Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben erhöht ist.

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die samen-spezifische heterologe Expression des Hefeproteins Gpd1p (G3PDH aus *Saccharomyces cerevisiae*; SEQ ID NO: 2) in *Arabidopsis*-Samen

45 zu einer signifikanten Erhöhung des Gehalts an Triacylglyceriden (Speicheröle) führt. Der Ölgehalt wurde dabei um etwa 22 %, in einer transgenen Linie sogar um 41 %, verglichen mit Wildtyp-

## 5

Kontrollpflanzen gesteigert (siehe Fig. 1). Die transgene Expression der Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase aus Hefe zeigte keine nachteiligen Effekte auf das Wachstum oder andere Eigenschaften der transformierten Pflanzen.

- 5 Da G3PDH ein Schlüsselenzym der Biosynthese in allen pflanzlichen Organismen ist, kann das erfindungsgemäße Verfahren im Prinzip auf alle Pflanzenarten - neben der als Modelnpflanze eingesetzten Art *Arabidopsis thaliana* - angewendet werden. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren auf Ölpflanzen angewendet, die
- 10 bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industriellen Gewinnung von Ölen verwendet werden.

- "Pflanzlicher Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben" meint allgemein jeden ein oder mehr-
- 15 zelligen Organismus oder ein Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) desselben, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und
- 20 dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen.

- 25 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und
- 30 andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungs-
- 35 stadium.

- "Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährige, monocotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis,
- 40 Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus,
- 45 Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis,

## 6

Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae, Umbelliferae.

10

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

15

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt aus dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen,

20 wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

25 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,

- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv 30 Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,

35 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,

- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

40

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,

45 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine)

## 7

und die Gattung *Capsicum*, ganz besonders die Art *annuum* (Pfeffer) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Theobroma cacao* (Kakaostrauch) und andere mehr,
  - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch) und andere mehr,
  - Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karrotte)) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie)) und andere mehr;
  - sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielfähig aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetales, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Krokus, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Insbesondere bevorzugt ist *Synechocystis*.

40

Am meisten bevorzugt sind Ölpflanzen. Ölpflanzen meint Pflanzen, die bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industrieller Gewinnung von Ölen verwendet werden. Diese Pflanzen können einen hohen Ölgehalt und/oder aber eine

besondere, industriell interessante Fettsäurezusammensetzung aufweisen. Bevorzugt sind Pflanzen, die einen Lipidanteil von mindestens 1 Gew.-% aufweisen. Ölpflanzen umfassen beispielsweise:



- Borago officinalis (Borretsch); Brassica Arten wie *B. campestris*, *B. napus*, *B. rapa* (Senf, Raps oder Rübsel); *Cannabis sativa* (Hanf); *Curthamus tinctorius* (Färberdiestel); *Cocos nucifera* (Kokosnuss); *Crambe abyssinica* (Krambe); *Cuphea* Arten (*Cuphea* Arten liefern fettsäuren von mittlerer Kettenlänge insbesondere für industrielle Anwendungen); *Elaeis guinensis* (Afrikanische Ölpalme); *Ekeis oleiferu* (Amerikanische Ölpalme); *Glycine max* (Sojabohne); *Gossypium hirsutum* (Amerikanische Baumwolle); *Gossypium barbadense* (Ägyptische Baumwolle); *Gossypium herbaceum* (Asiatische Baumwolle); *Helianthus annuus* (Sonnenblume); *Linum usitatissimum* (Lein oder Flachs); *Oenethem biennis* (Nachtkerze); *Ozea europea* (Olive); *Oryza sativa* (Rice); *Ricinus communis* (Castor); *Sesamum indicum* (Sesam); *Triticum* Arten (Weizen); *Zea maize* (Mais) sowie verschiedene Nussarten wie beispielsweise Walnuss oder Mandel.

"Gesamtölgehalt" meint die Summe aller Öle, bevorzugt die Summe die Triacylglyceride.

- "Öle" umfasst neutrale und/oder polare Lipiden und Mischungen derselben. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 aufgeführten zu nennen.

Tab. 1: Pflanzliche Lipidklassen

25

30

35

Neutrale Lipide	Triacylglycerol (TAG)
	Diacylglycerol (DAG)
	Monoacylglycerol (MAG)
Polare Lipide	Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)
	Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)
	Phosphatidylglycerol (PG)
	Phosphatidylcholine (PC)
	Phosphatidylethanolamine (PE)
	Phosphatidylinositol (PI)
	Phosphatidylserin (PS)
	Sulfoquinovosyldiacylglycerol

- Neutrale Lipide meint bevorzugt Triacylglyceride. Sowohl die neutralen als auch die polaren Lipide können ein breites Spektrum an verschiedenen Fettsäuren enthalten. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 2 aufgeführten Fettsäuren zu nennen.

45

Tab. 2: Übersicht über verschiedene Fettsäuren (Auswahl)

<sup>1</sup> Kettenlänge:Anzahl der Doppelbindungen

\* nicht natürlicherweise in Pflanzen vorkommend

5	Nomenklatur <sup>1</sup>	Name
	16:0	Palmitinsäure
	16:1	Palmitoleinsäure
	16:3	Roughaninsäure
	18:0	Stearinsäure
10	18:1	Ölsäure
	18:2	Linolsäure
	18:3	Linolensäure
	γ-18:3	Gamma-Linolensäure*
	20:0	Arachidinsäure
	22:6	Docosahexanonsäure (DHA) *
15	20:2	Eicosadienonsäure
	20:4	Arachidonsäure (AA) *
	20:5	Eicosapentaenosäure (EPA) *
	22:1	Erucasäure

20 Öle meint bevorzugt Samenöle.

"Erhöhung" des Gesamtölgehaltes meint die Steigerung des Gehaltes an Ölen in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe oder Organ derselben, bevorzugt in den Samenorganen der Pflanze. Dabei ist

25 der Ölgehalt im Vergleich zu einer nicht dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfenen, aber ansonsten unveränderten Ausgangspflanze unter ansonsten gleichen Rahmenbedingungen um mindestens 5 %, bevorzugt mindestens 10 %, besonders bevorzugt mindestens 15 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 20 %, am meisten

30 bevorzugt mindestens 25 % erhöht. Rahmenbedingungen meint dabei alle für die Keimung, Kultivierung oder Wachstum der Pflanze relevanten Bedingungen wie Boden-, Klima- oder Lichtverhältnisse, Düngung, Bewässerung, Pflanzenschutzmaßnahmen usw.

35 "Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase aus Hefe" (infolge "Hefe G3PDH") meint allgemein all solche Enzyme, die in der Lage sind, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerol-3-phosphat (G3P) - bevorzugt unter Verwendung eines Cosubstrates wie NADH - umzusetzen und natürlicherweise in einer Hefe exprimiert werden.

40

Hefen meint eine die Gruppe einzelliger Pilze mit ausgeprägter Zellwand und Bildung von Pseudomyzel (im Ggs. zu Schimmelpilzen). Ihre Vermehrung erfolgt vegetativ durch Sprossung und/oder Spaltung (Schizosaccharomyces bzw. Saccharomyces).

45

## 10

Umfasst sind sogenannte unechte Hefen, und zwar bevorzugt die Familien Cryptococcaceae, Sporobolomycetaceae mit den Gattungen Cryptococcus, Torulopsis, Pityrosporum, Brettanomyces, Candida, Kloeckera, Trigonopsis, Trichosporon, Rhodotorula bzw. Sporobolomyces und Bullera, sowie echte Hefen (Hefen mit auch geschlechtlicher Vermehrung; Ascus), und zwar bevorzugt die Familien Endomycetaceae, mit den Gattungen Saccharo-, Debaromyces, Lipomyces, Hansenula, Endomycopsis, Pichia, Hanseniaspora. Am meisten bevorzugt sind die Arten Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Zygosaccharomyces rouxii, Yarrowia lipolytica, Emericella nidulans, Aspergillus nidulans, Debaryomyces hansenii und Torulaspora hansenii..

15 Hefe G3PDH meint insbesondere Polypeptide die als "wesentlichen Eigenschaften" nachfolgende Eigenschaften aufweisen:

a) die Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat (EC 1.1.1.8),  
20 und

b) eine Peptidsequenz umfassend mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus

25 i) GSGNWGT(A/T)IAK (SEQ ID NO: 22)  
ii) CG(V/A)LSGAN(L/I/V)AXE(V/I)A (SEQ ID NO: 26)  
iii) (L/V)FXRPYFXV (SEQ ID NO: 27)

bevorzugt ist das Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe  
30 bestehend aus

iv) GSGNWGTTIAKV(V/I)AEN (SEQ ID NO: 29)  
v) NT(K/R)HQNVKYL (SEQ ID NO: 30)  
vi) D(I/V)LVFN(I/V)PHQFL (SEQ ID NO: 31)  
35 vii) RA(I/V)SCLKGFE (SEQ ID NO: 32)  
viii) CGALSGANLA(P/T)EVA (SEQ ID NO: 33)  
ix) LFHRPYFHV (SEQ ID NO: 34)  
x) GLGEII(K/R)FG (SEQ ID NO: 35)

40 besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2 oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive i), ii) und iii) oder ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive iv), v), vi), vii), viii), ix)  
45 und xiv). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Aminosäuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

## 11

Weiterhin kann eine Hefe G3PDH optional - zusätzlich zu mindestens einem der oben genannten Sequenzmotive i) bis x) - weitere Sequenzmotive umfassen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

5

xi) H(E/Q)NVKYL (SEQ ID NO: 23)

xii) (D/N) (I/V) (L/I)V(F/W) (V/N) (L/I/V)PHQF(V/L/I) (SEQ ID NO: 24)

xiii) (A/G) (I/V)SC(L/I)KG (SEQ ID NO: 25)

10 xiv) G(L/M) (L/G)E(M/I) (I/Q) (R/K/N)F(G/S/A) (SEQ ID NO: 28)

Am meisten bevorzugt meint Hefe G3PDH das Hefeproteins Gpd1p gemäß SEQ ID NO: 2, sowie funktionelle Äquivalente als auch funktionell äquivalente Teile der vorgenannten.

15

Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen des Hefeproteins Gpd1p gemäß SEQ ID NO: 2 sowie homologe Polypeptide aus anderen Hefen, die die gleichen wesentlichen Eigenschaften einer Hefe G3PDH, entsprechend

20 oben gegebener Definition, aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Insbesondere Bevorzugt sind die Polypeptide beschrieben durch SEQ ID NO: 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 38 oder 40.

25

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung vorteilhaft einzusetzenden Hefe G3PDH können durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken - unter Verwendung der beispielhaft aufgeführten Hefe G3PDH-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder der für

30 dieses kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 60 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %,

35 besonders bevorzugt mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu dem Protein mit der SEQ ID NO: 2.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die gesamte Sequenzlänge verstanden,

40 die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

45 Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

## 12

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist. Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 60 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu der Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 1 haben.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20	Gap Weight: 50	Length Weight: 3
	Average Match: 10	Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

30 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Hefe G3PDH aufweisen.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen, meint aber bevorzugt stringent Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Bei-  
 45 spielhaft können die Bedingungen während des Waschschrates ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC:

## 13

0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskonstrukte, die eine transgene Expression einer Hefe G3PDH, in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil Zellen oder Vermehrungsmaterial des

10 besagten pflanzlichen Organismus gewährleisten können.

Für die Hefe G3PDH gilt dabei die oben genannte Definition, besonders bevorzugt ist die transgene Expression einer Hefe G3PDH beschrieben durch die Sequenz mit der SEQ ID NO: 2.

15

In besagten transgenen Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für eine Hefe G3PDH bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine

20 Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsmaterial desselben gewährleistet.

Insbesondere bevorzugt sind transgene Expressionskassetten, wobei

25 die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase beschrieben ist durch

a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 oder

30

b) eine Sequenz, die sich entsprechend dem degenerierten genetischen Code von einer Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 ableitet, oder

35 c) eine Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % zu der Sequenz mit der SEQ ID NO: 1 aufweist.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu

40 exprimierenden Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu

45 ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter ent-

## 14

fernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide

5 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

10

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer transgenen Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und

15 Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin

20 et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines

25 Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein

30 pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer transgenen Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH so hinter einen endogenen,

35 pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die Expression der Hefe G3PDH bewirkt.

Bevorzugt werden in den transgenen Expressionskassetten Promotoren eingesetzt, die in einem pflanzlichen Organismus

40 oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsmaterial desselben funktionell sind. In pflanzlichen Organismen funktionelle Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann.

45 Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

- 5 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise
- 10 verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986)
- 15 Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor
- 20 (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor
- 25 (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-einheiten, den Promotor des Nitrilase-1 Gens aus Arabidopsis
- 30 thaliana (GenBank Acc.-No.: U38846, Nukleotide 3862 bis 5325 oder alternativ 5342) oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Besonders bevorzugt sind der CaMV
- 35 35S-Promotor und der Nitrilase-1 Promotor aus Arabidopsis thaliana.

b) Gewebespezifische Promotoren

- 40 Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für Samen, wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol
- 45 Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta



## 16

199:515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980).

Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

20

c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden. Ferner geeignet ist der Promotor des Glutathione-S-transferase Isoform II Gens (GST-II-27), der durch exogen applizierte Safener wie z.B. N,N-Diallyl-2,2-dichloroacetamid aktiviert werden kann (WO 93/01294) und in zahlreichen Geweben von sowohl Monokotyledonen als auch Dikotyledonen funktionell ist.

Besonders bevorzugt sind konstitutive sowie ganz besonders bevorzugt samenspezifische Promotoren, insbesondere der Napin- und der USP-Promotor.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengewebe oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als  
 5 Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können  
 10 mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontroll-  
 15 sequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzenspezifischen  
 20 Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

25 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren  
 30 erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

35 Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren  
 40 Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von  
 45 Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116,

## 18

- Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente
- 5 Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).
- 10 Die transgene Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende
- 15 der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.
- 20 Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase)
- 25 des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.
- 30 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen
- 35 die für eine dsRNA kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende
- 40 Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.
- Eine transgene Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten transgenen Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten.
- 45 Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten,

Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen  
5 Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen  
10 Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat®  
15 (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxido-reduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die  
20 für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kana-  
25 mycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).  
30
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-  
ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders  
35 bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luzi-  
ferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-  
40 Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).
- 45 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungs-  
gemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin

## 20

of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5

- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

- 10 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxy-glucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).
- 20 Zusätzlich kann besagte transgene Expressionskassette oder Vektoren weitere Nukleinsäuresequenzen enthalten, die nicht für eine Hefe G3PDH kodieren, und deren transgene Expression zu einer zusätzlichen Steigerung der Fettsäure-Biosynthese führt (infolge proOIL). Diese zusätzlich transgen exprimierte proOIL Nukleinsäuresequenz kann beispielhaft aber nicht einschränkend ausgewählt sein aus Nukleinsäuren kodierend für Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAT), Lysophosphatidat-Acyltransferase (LPAT), Diacylglycerol-Acyltransferase (DAGAT) und Phospholipid:diacylglycerol-acyltransferase (PDAT).
- 25 säuresequenz kann beispielhaft aber nicht einschränkend ausgewählt sein aus Nukleinsäuren kodierend für Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAT), Lysophosphatidat-Acyltransferase (LPAT), Diacylglycerol-Acyltransferase (DAGAT) und Phospholipid:diacylglycerol-acyltransferase (PDAT).
- 30 Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt und aus Datenbanken oder entsprechenden cDNA-Banken der jeweiligen Pflanzen leicht zugänglich.

- Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in
- 35 einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskassetten enthalten sind. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung
- 40 betrifft daher besagte transgene Vektoren, die eine transgene Expressionskassette für eine Hefe G3PDH umfassen.

- Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Die Expressionskassette kann in
- 45 den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Der entstandene Vektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt trans-

formierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene pflanzliche Organismen oder Gewebe, Organ, Teil, Zellen oder Vermehrungsgut desselben, die eine Hefe G3PDH entsprechend oben gegebener Definition, eine transgene Expressionskassette für eine Hefe G3PDH oder einen transgenen Vektor umfassend eine solche Expressionskassette enthalten.
- 15 Die Herstellung eines entsprechenden transgenen pflanzlichen Organismus erfolgt z.B. mittels Transformation oder Transfektion mittels der entsprechenden Proteine oder Nukleinsäuren. Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende
- 20 DNA (z.B. der Expressionsvektor), RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann
- 25 die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch
- 30 Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Möglich sind ferner das Quellen von
- 35 Pflanzenteilen in DNA-Lösungen sowie Pollen- oder Pollenschlauchtransformation. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhaase et al. (1987) Theor Appl
- 40 Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular
- 45 Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

## 22

- Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzen-  
geweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Trans-  
formation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Proto-  
5 plastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-  
Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die  
sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation,  
die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und  
die Mikroinjektion.
- 10 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Trans-  
formation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium*  
*tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* und Übertragung von  
entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden  
15 durch oder durch Infektion mit transgenen Pflanzenviren durch-  
geführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation  
ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die  
Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al.  
(1985) Science 225: 1229f).
- 20 Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die Expressionskassette  
in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischen-  
vektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen  
binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation  
25 verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung,  
meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder  
Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden  
Expressionskassette verbunden.
- 30 Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren  
können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren.  
Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen  
Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken  
T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium*  
35 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet  
163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion  
transformierter *Agrobakteria* und ist zum Beispiel das nptII Gen,  
das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall  
als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein  
40 Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Über-  
tragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein  
so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanz-  
licher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur  
Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und  
45 beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector  
System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter V;  
An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren

## 23

sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind  
5 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden  
10 Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen  
15 regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von  
20 untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.).  
25 Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiele sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, das Resistenz gegen das Herbizid  
30 Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von trans-  
35 formierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

40

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in  
Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von  
SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus  
45 (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans-



formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann  
5 eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt  
10 und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)  
15 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Hefe G3PDH Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte G3PDH Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

- 25
- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH, oder
  - b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein in  
30 pflanzlichen Organismen funktioneller Promotor, oder
  - c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden  
35 oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus  
40 oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens  
45 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise

## 25

die natürlich vorkommende Kombination des Promotors eines Gens kodierend für eine Hefe G3PDH mit dem entsprechenden Hefe G3PDH-Gen wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie  
5 beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangs-  
10 organismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches, insbesondere Pflanzen, die für die Gewinnung von Ölen verwendet werden wie beispielsweise Raps, Sonnenblume,  
15 Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja, Mais, Weizen und Nussarten. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des  
20 Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion  
25 von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei  
30 transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere von Ölen, Fetten, Fettsäuren oder Derivaten der vorgenannten.

35 Neben der Beeinflussung des Ölgehaltes kann die transgene Expression einer Hefe G3PDH in Pflanzen noch weitere vorteilhafte Effekte vermitteln, wie beispielsweise eine erhöhte Stressresistenz z.B. gegen osmotischen Stress. Die Hefe G3PDH vermittelt über erhöhte Glycerolspiegel einen Schutz gegen derartigen Stress, indem Glycerol als Osmoprotektivum wirkt. Derartige osmotischer Stress tritt beispielsweise bei salzhaltigen Böden und Wasser auf und ist ein zunehmendes Problem in der Landwirtschaft. Eine erhöhte Stresstoleranz bietet hier beispielsweise  
40 die Möglichkeit zur landwirtschaftlichen Nutzung von Flächen, in denen übliche Ackerpflanzen nicht gedeihen können.

## 26

Ferner kann die transgene Expression der Hefe G3PDH den NADH Spiegel und so das REDOX-Gleichgewicht in dem pflanzlichen Organismus beeinflussen. Stress, wie beispielsweise Trockenheit, Hitze, Kälte, UV Licht etc. kann zu erhöhten NADH Spiegeln und zu einer vermehrten Bildung von reaktivem Sauerstoff (ROS) führen. Die transgene Expression der Hefe G3PDH kann einen unter besagten Stressbedingungen anfallenden NADH Überschuss abbauen, so das REDOX-Gleichgewicht stabilisieren und die Auswirkungen des Stress mildern.

10

15

20

25

30

35

40

45

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae*  
5 G3PDH (Gpd1p)
2. SEQ ID NO: 2  
Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH  
(Gpd1p)  
10
3. SEQ ID NO: 3  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae*  
G3PDH (Gpd2p)
- 15 4. SEQ ID NO: 4  
Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH  
(Gpd2p)
5. SEQ ID NO: 5  
20 Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH  
(Gpd2p) mit zweitem, alternativem Start-Codon
6. SEQ ID NO: 6  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe*  
25 G3PDH
7. SEQ ID NO: 7  
Proteinsequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe* G3PDHD  
30
8. SEQ ID NO: 8  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe*  
G3PDH
- 35 9. SEQ ID NO: 9  
Proteinsequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe* G3PDH
10. SEQ ID NO: 10  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH  
40
11. SEQ ID NO: 11  
Proteinsequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH
12. SEQ ID NO: 12  
45 Proteinsequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH, mit  
zweitem, alternativem Start-Codon

13. SEQ ID NO: 13  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii*  
G3PDH
- 5 14. SEQ ID NO: 14  
Proteinsequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
15. SEQ ID NO: 15  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii*  
10 G3PDH
16. SEQ ID NO: 16  
Proteinsequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
- 15 17. SEQ ID NO: 16  
Expressionsvektor auf Basis von pSUN-USP für *S.cerevisiae*  
G3PDH (Gpd1p; Insert von bp 1017 - 2190)
- 20 18. SEQ ID NO: 18 Oligonukleotidprimer ONP1  
5'-ACTAGTATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3'
19. SEQ ID NO: 19 Oligonukleotidprime ONP2  
5'-CTCGAGATCTTCATGTAGATCTAATT-3'
- 25 20. SEQ ID NO: 20 Oligonukleotidprime ONP3  
5'-GCGGCCGCGCATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3'
21. SEQ ID NO: 21 Oligonukleotidprime ONP4  
5'-GCGGCCGCGCATCTTCATGTAGATCTAATT-3'
- 30 22-35: SEQ ID NP 22 bis 35: Sequenzmotive für Hefe G3PDHs mit  
Angabe von möglichen Sequenzvariationen. Die Variationen  
eines einzelnen Motives können jeweils einzeln aber auch  
in den unterschiedlichen Kombinationen miteinander vor-  
35 kommen.
36. SEQ ID NO: 36  
Expressionsvektor pGPTV-gpd1 auf Basis von pGPTV-Napin für  
*S.cerevisiae* G3PDH (Gpd1p; Insert gdp1 von bp 11962-13137;  
40 nos-Terminator: 13154-13408; Napin-Promotor: 10807-11951).
37. SEQ ID NO: 37  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Emericella nidulans* G3PDH
- 45 38. SEQ ID NO: 38  
Aminosäuresequenz kodierend für *Emericella nidulans* G3PDH

39. SEQ ID NO: 39

Nukleinsäuresequenz kodierend für *Debaryomyces hansenii* G3PDH (partiell)

5 40. SEQ ID NO: 40

Aminosäuresequenz kodierend für *Debaryomyces hansenii* G3PDH (partiell)

# Abbildungen

10

Fig. 1: Ölgehalt in transgenen GPD1p-Linien

15

20

Messung des TAG-Gehalts in T2 Samen von transgenen Arabidopsis-Linien mit dem Gpd1p-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (G2 bis G30). Zum Vergleich ist der Gehalt in entsprechenden untransformierten (Wilttyp-Pflanzen; W1 bis W10) bestimmt worden. Es wurden 8 Arabidopsis-Linien mit einem signifikant gesteigertem Ölgehalt identifiziert. Die angegebenen Fehlerabweichung ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Messungen.

Fig. 2: Bestimmung des Ölgehalts in Samen der T3 Generation.

25

30

Wiedergegeben ist der Ölgehalt (in mg Lipid pro g Trockengewicht (DW)) einzelner Arabidopsis-Linien. Jede Säule stellt den Mittelwert aus 6 individuellen Pflanzen pro unabhängiger Linie dar. Von jeder Pflanze wurde eine dreifach Bestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalker bezeichnen die Standardabweichung über alle Werte. Die Kontrollpflanzen sind mit 'col' bezeichnet. Die Einzelwerte sind numerisch zusätzlich in folgender Wertetabelle wiedergegeben (die Kontrolle wurde auf 100% Ölgehalt gesetzt):

35

40

45

Linien	Ölgehalt (mg/g)	STD	Rel. Anstieg in %
col	278,1	12,2	100
#11	304,6	18,3	110
#12	301,4	19,0	108
#13	275,2	89,7	99
#21	323,2	77,0	116
#24	268,9	15,1	97
#25	293,6	23,0	106
#27	285,6	18,4	103
#41	316,1	19,1	114
#53	260,3	16,4	94
#67	292,0	13,8	105
#71	244,1	11,6	88
#82	295,6	16,8	106

## 30

Linien mit einem statistisch signifikant erhöhtem Lipidgehalt (Linien #11, #21, #41 und #67) sind mit schwarzen Balken präsentiert.

5 Fig. 3: Bestimmung der Aktivität von G3PDH in der Kontrolle (,col') und den gdp1 transformierten Pflanzen.

10 Die G3PDG Aktivität der einzelnen Linien wurde wie in Beispiel 8 beschrieben bestimmt und ist in nmol G3P pro Minute und g Feuchtgewicht (FW) wiedergegeben.

	G3PDH Aktivität	STD
col	6,68337432	0,71785229
#11	11,8958635	1,67941604
#12	9,14226124	2,25411878
15 #13	8,8210768	2,19519777
#21	9,88435444	1,04798566
#24	5,89378595	1,26005769
#25	5,14179348	1,22845409
#27	6,77303725	3,22220935
20 #41	20,8325636	5,42018531
#53	7,45794947	2,25573816
#67	12,7670015	0,74678353
#71	9,04748534	1,59829185
#82	9,37260033	2,1356558

25 Linien mit einer statistisch signifikant erhöhten G3PDH-Aktivität (Linien #11, #21, #41 und #67) sind mit schwarzen Balken präsentiert. Es ist erkennbar, dass eine erhöhte G3PDG Aktivität mit einem erhöhten Lipidgehalt korreliert.

30

Beispiele

Allgemeine Methoden:

35 Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, stammen von den Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Molekularbiologie-Kits wurden von den  
 40 Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Qiagen (Hilden), Stratagen (Amsterdam, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe) und Ambion (Cambridgeshire, United Kingdom). Die verwendeten  
 45 Reagenzien wurden entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

## 31

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

## Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* repräsentiert ein Mitglied der höheren Pflanzen (Samenpflanzen). Diese Pflanze ist eng verwandt mit anderen Pflanzenarten aus der Familie der Cruciferen wie z.B. *Brassica napus*, aber auch mit anderen Pflanzenfamilien der Dikotyledonen. Aufgrund des hohen Grades an Homologie ihrer DNA-Sequenzen bzw. Polypeptidsequenzen kann *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze für andere Pflanzenarten eingesetzt werden.

a) Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen

Die Pflanzen werden entweder auf Murashige-Skoog Medium mit 0,5 % Saccharose (Ogas et al. (1997) Science 277:91-94) oder auf Erde gezogen (Focks & Benning (1998) Plant Physiol 118:91-101). Um einheitliche Keimungs- und Blühzeiten zu erreichen, werden die Samen nach Ausplattieren bzw. Ausstreuen auf Erde zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Nach der Blüte werden die Schoten markiert. Entsprechend der Markierungen werden dann Schoten mit einem Alter von 6 bis 20 Tagen nach der Blüte geerntet.

## Beispiel 2: Klonierung des Gpd1-Gens aus Hefe

Genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288C (Mat alpha SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde nach folgendem Protokoll isoliert:

Eine 100 ml Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 30°C angezogen. Davon wurden 60 ml abzentrifugiert bei 3000 xg für 3 min. Das Pellet wurde in 6 ml doppelt-destilliertem H<sub>2</sub>O



## 32

resuspendiert und auf 1,5 ml Gefäße verteilt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit 200 µl Lösung A, 200 µL Phenol/Chloroform (1:1) und 0,3 g Glaskugeln durch Vortexen resuspendiert und lysiert. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer pH 8,0 wurde für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ethanol-fällung mit 1 ml Ethanol unterzogen. Das erhaltene Pellet nach Fällung wurde in 400 µL TE-Puffer pH 8,0 + 30 µg/mL RnaseA gelöst. Nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurden 18 µL 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 und 1 mL Ethanol zugegeben und die präzipitierte DNA durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 25 µL doppelt-destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der genomischen DNA wurde durch deren Absorption bei 260 nm bestimmt.

## 15 Lösung A:

2 % Triton-X100

1 % SDS

0,1 M NaCl

0,01 M Tris-HCl pH 8,0

## 20 0,001 M EDTA

Für die Klonierung des Gpd1-Gens wurde die isolierte Hefe-DNA in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidprimern ONP1 und ONP2 eingesetzt.

## 25

ONP1: 5'-ACTAGTATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3' (SEQ ID NO: 18)

ONP2: 5'-CTCGAGATCTTCATGTAGATCTAATT-3' (SEQ ID NO: 19)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

## 30

5,00 µL 5 µg genomische Hefe-DNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25 mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2 mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

## 35 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

PCR-Programm:

## 40 Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschließende Extension von 5 min bei 72°C.

Das PCR-Produkte wurde in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen)

## 45 gemäß Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem Vektor pCR2.1-gpd1 und die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft.

## 33

- Für die Klonierung in den Agrottransformationsvektor pGPTV wurden 0,5 µg des Vektors pCR2.1-gpd1 mit den Restriktionsenzym XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunde inkubiert und anschließend 15 min mit Klenow-Fragment (New England Biolabs) inkubiert. Nach
- 5 Inkubation für 2 Stunden mit SpeI wurden die DNA-Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das neben dem Vektor (3,9 kb) 1185 bp große Fragment der gpd1-Sequenz wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "Gelpurification"-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer
- 10 eluiert. 0,1 µg des Vektors pGPTV wurde zuerst für 1 Stunde mit dem Restriktionsenzym SacI verdaut, dann für 15 min mit Klenow-Fragment (New England Biolabs) inkubiert. 10 µL des Eluates des gpd1-Fragments und 10 ng des behandelten Vektors pGPTV wurden über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase von New England Biolabs).
- 15 Die Ligationsprodukte werden dann in TOP10 Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert, resultierend in dem Vektor pGPTV-gpd1. Positive Klone werden mit den Primern ONP1 und ONP2 durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

20

Für die Herstellung des Vektors pSUN-USP-gpd1 wurde eine PCR vom Vektor pCR2.1-gpd1 mit den Primern ONP3 und ONP4 durchgeführt.

ONP3: 5'-GCGGCCGCCATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3' (SEQ ID NO: 20)

25 ONP4: 5'-GCGGCCGCATCTTCATGTAGATCTAATT-3' (SEQ ID NO: 21)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5 ng DNA Plasmid pCR2.1-gpd1

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25 mM MgCl<sub>2</sub>

30 5,00 µL 2 mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/uL)

0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

35

PCR-Programm:

Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschließende Extension von 5 min bei 72°C.

40

Das 1190 bp große PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym NotI für 24 Stunden verdaut. Der Vektor pSUN-USP wurde für 2 Stunden mit NotI verdaut, dann 15 min mit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) inkubiert. 100 ng des vor-

45 behandelten gpd1-Fragments und 10 ng des behandelten Vektors pGPTV wurden über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase von New England Biolabs). Die Ligationsprodukte werden dann in TOP10

## 34

Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert, resultierend in dem Vektor pSUN-USP-gpd1. Positive Klone werden mit den Primern ONP3 und ONP4 durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

5

Beispiel 3: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66: 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

15

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden.

Ein weiteres Beispiel für binäre Vektoren ist der Vektor pSUN-USP und pGPTV-Napin in welche das Fragment aus Beispiel 2 kloniert wurde. Der Vektor pSUN-USP enthält den USP-Promotor sowie den OCS Terminator. Der Vektor pGPTV-Napin enthält einen verkürzte Version des Napin-Promotors und den nos-Terminator.

Die Fragmente aus Beispiel 2 wurden in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pSUN-USP bzw. pGPTV-Napin kloniert, um die samenspezifische Expression des gdp1 Genes zu ermöglichen. Das entsprechende Konstrukt pSUN-USP-gdp1 ist mit der SEQ ID NO: 17 beschrieben, das Konstrukt von G3PDH in pGPTV-Napin (pGPTV-gdp1) ist durch SEQ ID NO: 36 beschrieben.

35

Beispiel 4: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung der Agrobacterium tumefaciens-Stämme GV3101 (pMP90) (Koncz und Schell (1986) Mol Gen Genet 204: 383-396) oder LBA4404 (Clontech) durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al. (1984) Nucl Acids Res 13:4777-4788).

45

## 35

## Beispiel 5: Pflanzentransformation

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-  
 5 techniken durchgeführt werden (Gelvin SB, Schilperoort R, Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick BR, Thompson JE, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S.,  
 10 ISBN 0-8493-5164-2).

Die Transformation mittels Agrobacterium von Arabidopsis thaliana wurde durch die Methode nach Bechthold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 316, 1194-1199) durchgeführt.

15

Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyl-transformation transformiert werden (Moloney et al. (1989) Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al. (1989) Plant Physiol 91: 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium-  
 20 und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Raps-selektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

25 Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (Linum usitatissimum) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen. Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047  
 30 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchen-  
 35 beschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

40 Beispiel 6: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der  
 45 Translationsebene gemessen.

## 36

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt

5 (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so

10 dass, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der

15 Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

20

## Northern-Hybridisierung:

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit

25 einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und

30 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringsperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von

35 alpha-<sup>32</sup>P-dCTP (Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS,

40 bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie

45 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-

Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer  
5 chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

**10 Beispiel 7: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes**

- Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Ver-  
15 bindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h.  
20 von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analyse-techniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie  
25 (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon A et al. (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III:  
30 "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter PA et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy JF und Cabral JMS (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz JA und Henry JD (1988) Biochemical  
35 Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).
- 40 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben  
45 bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide -

Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

5

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die

- 10 Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin
- 20 angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschicht-

25 chromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC,

30 wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

- 35 Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C
- 40 erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und
- 45 schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min

und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

5

Für die quantitative Öl-Analyse der mit dem Gpd1-Gen transformierten Arabidopsis Pflanzen wurde folgendes Protokoll angewendet:

- 10 Die Extraktion der Lipide aus Samen wird nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) Can J Biochem Physiol 37:911 durchgeführt. Dazu werden 5 mg Arabidopsis Samen in 1,2 ml Qiagen-Microtubes (Qiagen, Hilden) auf einer Sartorius (Göttingen) Mikrowaage abgewogen. Das Samenmaterial wird mit 500 uL Chloroform/Methanol
- 15 (2:1; enthält Mono-C17-glycerin von Sigma als internen Standard) in der Rätschmühle MM300 der Firma Retsch (Haan) homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 uL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 erfolgt die Phasentrennung. Von der organischen Phase werden 50 µL abgenommen, mit 1500 uL Chloroform
- 20 verdünnt und 5 µL auf die Kapillaren Chromarods SIII der Firma Iatroscan (SKS, Bechenheim) aufgetragen. Nach Auftrag der Proben werden diese für 15 min in einer Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 6:2:2 Chloroform: Methanol: Toluol in einem ersten Schritt aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit werden die Kapillaren
- 25 4 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 22 min in eine Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 7:3 n-Hexan:Dieethylether gestellt. Nach einem weiteren Trocknungsschritt für 4 min bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Iatroscan MK-5 (SKS, Bechenheim) entsprechend Fraser & Taggart, 1988 J.
- 30 Chromatogr. 439:404 analysiert. Folgende Parameter wurden für die Messungen eingestellt: Slice width 50 msec, Treshold 20 mV, Noise 30, Skim ratio 0. Die Quantifizierung der Daten erfolgte anhand des internen Standards Mono-C17-glycerin (Sigma) sowie einer erstellten Eichkurve mit Tri-C17-glycerin (Sigma) mittels
- 35 des Programms ChromStar (SKS, Bechenheim).

Für die quantitative Bestimmung der Ölgehalte wurden T2 Samen von mehreren, unabhängigen transgenen Linien mit den Konstrukten pSUN-USP-gpd1 bzw. pGPTV-gpd1 analysiert. Von den Samenpools

- 40 jeder Linie wurden drei unabhängige Extraktionen durchgeführt und die Extrakte unabhängig gemessen. Aus den drei unabhängigen Messungen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

- 45 Das Ergebnis der Messungen für die Linien mit dem Konstrukt pGPTV-gpd1 zeigte einen signifikant höheren Ölgehalt in mehreren (10) transgenen Linien (Fig. 1), verglichen mit den Messungen



## 40

von 10 Wildtyp-Pflanzen. Für das Konstrukt pSUN-USP-gpd1 werden ähnliche Ölgehalte gemessen (nicht gezeigt).

Der durchschnittliche Ölgehalt der oben aufgeführten Linien beträgt  $34,86 \pm 1,56 \%$ , während der Durchschnitt der Wildtyp-pflanzen bei  $27,75 \pm 2,64 \%$  liegt. Dies entspricht einer Steigerung des Ölgehalts um absolut 7,1 % (relativ 25,6 %).

Zur Kontrolle der Vererbbarkeit des Effektes von gdp1 (Steigerung des Ölgehaltes) wurden T2 Samen von den Linien mit erhöhten Ölgehalten sowie von Linien mit unverändertem Ölgehalt angezogen. Jeweils 6 Pflanzen pro Linien wurden ausgebracht und die Samen auf Ölgehalt und Enzymaktivität überprüft. Die Bestimmung des Ölgehaltes erfolgte entsprechend der oben ausgeführten Methodik. Die erhaltenen Werte sind in Fig. 2 dargestellt. Als Kontrollen dienen Col-0 und C24 Arabidopsis Ecotypen. C24 ist dabei ein Ecotyp, der sich durch einen höheren Ölgehalt als Col-0 auszeichnet. Es konnten Linien charakterisiert werden, die einen erhöhten Ölgehalt zu Col-0 zeigen. Damit konnte die Vererbbarkeit der Erhöhung des Ölgehaltes als Effekt der Expression des gdp1-Genes demonstriert werden.

Beispiel 8: Bestimmung von Glycerol-3-phosphatdehydrogenaseaktivität

25

Ein weiteres Ziel war neben der Erhöhung des Ölgehalts auch die direkte Wirkung des Enzyms in den transgenen Pflanzen nachzuweisen. Zur Bestimmung der Glycerol-3-phosphatdehydrogenase-Aktivität wurde je Pflanze zwei Arabidopsis Samenschoten geerntet und nach Geigenberger und Stitt ((1993) Planta 189:329-339) extrahiert. Dazu wurden die Schoten in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zermalen und mit 200  $\mu$ L 50 mM HEPES pH 7,4, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 0,1 % (w/w) Rinderserumalbumin, 2 mM Benzamidin, 2 mM Amino-n-capronsäure, 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl, 0,1 % Triton X-100 und 10 % Glycerin (w/w) aufgenommen, 5 min zentrifugiert und der Überstand aliquotiert. Für die G3PDH Aktivität wurde die Produktion von G3P (Glycerin-3-phosphat) aus den Substraten DHAP (Dihydroxyacetonephosphat) und NADH gemessen. Dazu wurde die Oxidation von NADH bei 340 nm verfolgt.

40

Der Reaktionsmix zur Bestimmung der Aktivität enthielt 50 mM HEPES pH 7,4, 4 mM DHAP, 0,2 mM NADH und 10  $\mu$ L des Extraktionsmixes in einem Endvolumen von 100  $\mu$ L. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Erhitzen (20 min, 95°C) gestoppt. In der Kontrollreaktion wurde sofort durch Erhitzen inaktiviert.

## 41

Glycerol-3-phosphat "Cycling-Assay": 10  $\mu$ l des Reaktionsgemisches wurden zu 45  $\mu$ l einer Lösung enthaltend 200 mM Tricin,  $\text{MgCl}_2$  5 mM (pH 8,5) gegeben und erhitzt (20 min, 95°C), um verbleibendes DHAP zu zerstören. Der Überstand wurde in eine 96-Well Microplatte 5 überführt, mit 45  $\mu$ l eines Gemisches versetzt, welches 2 units G3Pox, 130 units Katalase, 0,4 unit G3PDH und 0,12  $\mu$ mol NADH enthielt. Die Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt und die resultierende Absorption bei 340 nm in einer Anthos htII Microplatten-Lesegerät verfolgt. Reaktionsgeschwindigkeiten wurden anhand der 10 Absorptionsabnahme in (MOD\*min<sup>-1</sup>) unter Verwendung der Biolise software berechnet (Gibon Y et al. (2002) Plant J 30(2):221-235).

Die transgenen Linien #11, #21, #41 und #67 zeigten dabei eine signifikant erhöhte Enzymaktivität im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Fig. 3). Die Pflanzen mit erhöhtem Ölgehalt korrelieren mit 15 den Pflanzen mit erhöhter Enzymaktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Ölgehalt auf den erhöhten Umsatz von DHAP zu G3P, der Vorstufe zur Ölsynthese, zurückzuführen ist.

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Erhöhen des Gesamtölgehalt in einem pflanz-  
 5 lichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle  
 oder Vermehrungsgut desselben, umfassend
  - a) transgene Expression einer Glycerol-3-phosphat Dehydro-  
 10 genase aus einer Hefe in besagtem pflanzlichen Organismus  
 oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut  
 desselben und
  - b) Auswahl von pflanzlichen Organismen, bei denen - im  
 15 Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - der  
 Gesamtölgehalt in dem besagten pflanzlichen Organismus  
 oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut  
 desselben erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Glycerol-3-phosphat  
 20 Dehydrogenase aus einer Hefe stammt ausgewählt aus den  
 Gattungen Cryptococcus, Torulopsis, Pityrosporum, Brettano-  
 myces, Candida, Kloeckera, Trigonopsis, Trichosporon, Rhodo-  
 torul, Sporobolomyces, Bullera, Saccharomyces, Debaromyces,  
 Lipomyces, Hansenula, Endomycopsis, Pichia und Hanseniaspora.
- 25 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die  
 Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe stammt  
 ausgewählt aus den Arten Saccharomyces cerevisiae, Pichia  
 30 pastoris, Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe,  
 Kluyveromyces lactis, Zygosaccharomyces rouxii, Yarrowia  
 lipolitica, Emericella nidulans, Aspergillus nidulans,  
 Debaryomyces hansenii und Torulaspora hansenii.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die  
 35 Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase die Umsetzung von  
 Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Ver-  
 wendung von NADH als Cosubstrat bewirkt und eine Peptid-  
 sequenz aufweist, die mindestens ein Sequenzmotiv umfasst  
 ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus  
 40
  - i) GSGNWGT(A/T)IAK
  - ii) CG(V/A)LSGAN(L/I/V)AXE(V/I)A
  - iii) (L/V)FXRPYFXV

45

Sequ + Zeichn.

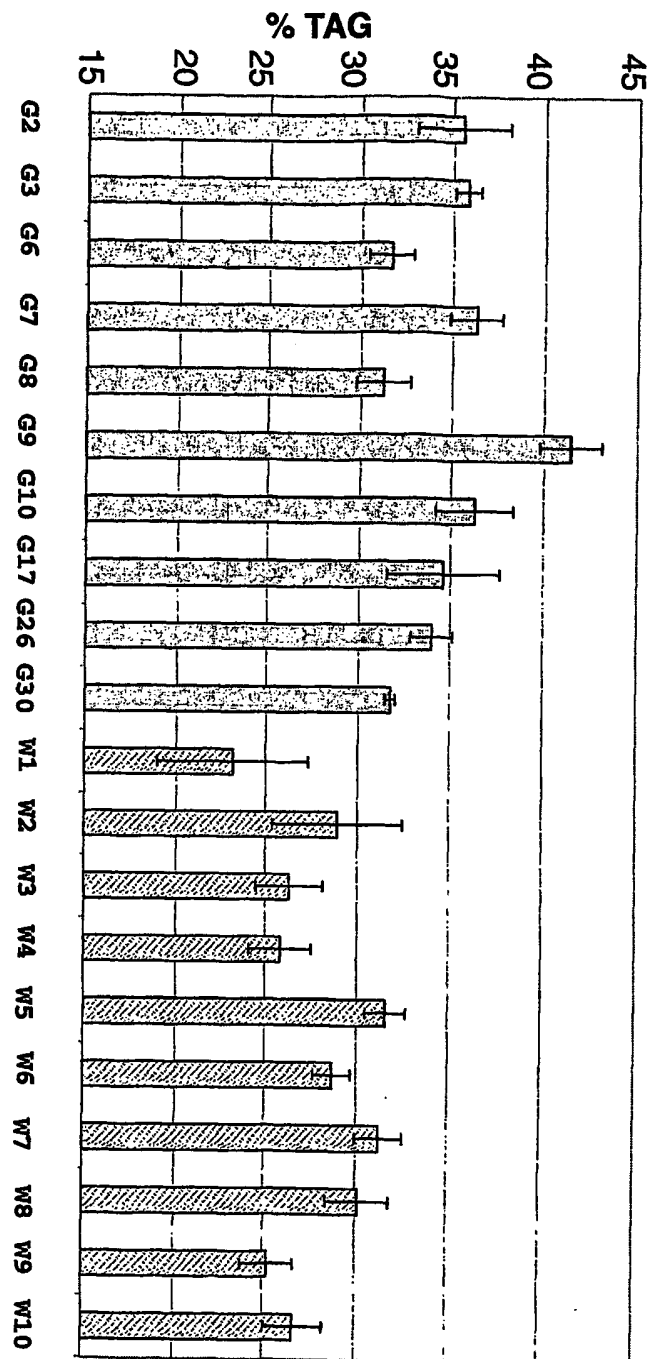
## 43

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase die Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat bewirkt und eine Peptidsequenz aufweist, die mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
- iv) GSGNWGTTIAKV(V/I)AEN  
v) NT(K/R)HQNVKYL
- 10 vi) D(I/V)LVFN(I/V)PHQFL  
vii) RA(I/V)SCLKGFE  
viii) CGALSGANLA(P/T)EVA  
ix) LFHRPYFHV  
x) GLGEII(K/R)FG
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zusätzlich mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
- 20 xi) H(E/Q)NVKYL  
xii) (D/N)(I/V)(L/I)V(F/W)(V/N)(L/I/V)PHQF(V/L/I)  
xiii) (A/G)(I/V)SC(L/I)KG  
xiv) G(L/M)(L/G)E(M/I)(I/Q)(R/K/N)F(G/S/A)
- 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe beschrieben ist durch
- 30 a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 38 oder 40, oder
- b) ein funktionelle Äquivalent von a) mit einer Identität von mindestens 60% eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 2.
- 35 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze eine Ölpflanze ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Gesamtölgehalt im Samen einer Pflanze erhöht wird.
- 40 10. Transgene Expressionskassette umfassend unter Kontrolle eines in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben funktionellen Promotors eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-
- 45

## 44

phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe entsprechend den Definitionen in einem der Ansprüche 2 bis 7.

11. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 10, wobei die  
5 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase beschrieben ist durch
- a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15,  
37 oder 39 oder
- 10 b) eine Sequenz, die sich entsprechend dem degenerierten genetischen Code von einer Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 ableitet, oder
- 15 c) eine Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % zu der Sequenz mit der SEQ ID NO: 1 aufweist.
12. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10  
oder 11, wobei der Promotor ein samenspezifischer Promotor  
20 ist.
13. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
- 25 14. Transgener pflanzlicher Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben, enthaltend eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe entsprechend den Definitionen in einem der Ansprüche 2 bis 7 oder eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder  
30 einen Vektor nach Anspruch 13.
15. Transgener pflanzlicher Organismus nach Anspruch 14, wobei der pflanzliche Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe der Ölpflanzen bestehend aus *Borago officinalis*, *Brassica campestris*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*,  
35 *Curthamus tinctorius*, *Cocos nucifera*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* Arten, *Elaeis guinensis*, *Ekeis oleiferu*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum*, *Helianthus annuus*, *Linum usitatissimum*, *Oenethem biennis*, *Ozea europea*, *Oryza sativa*, *Ricinus communis*,  
40 *Sesamum indicum*, *Triticum* Arten, *Zea maize*, Walnuss und Mandel.
16. Verwendung eines transgenen pflanzlichen Organismus oder  
45 Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben nach einem der Ansprüche 14 oder 15 zur Herstellung von Ölen, Fetten, freien Fettsäuren oder Derivaten der vorgenannten:

**Fig. 1**

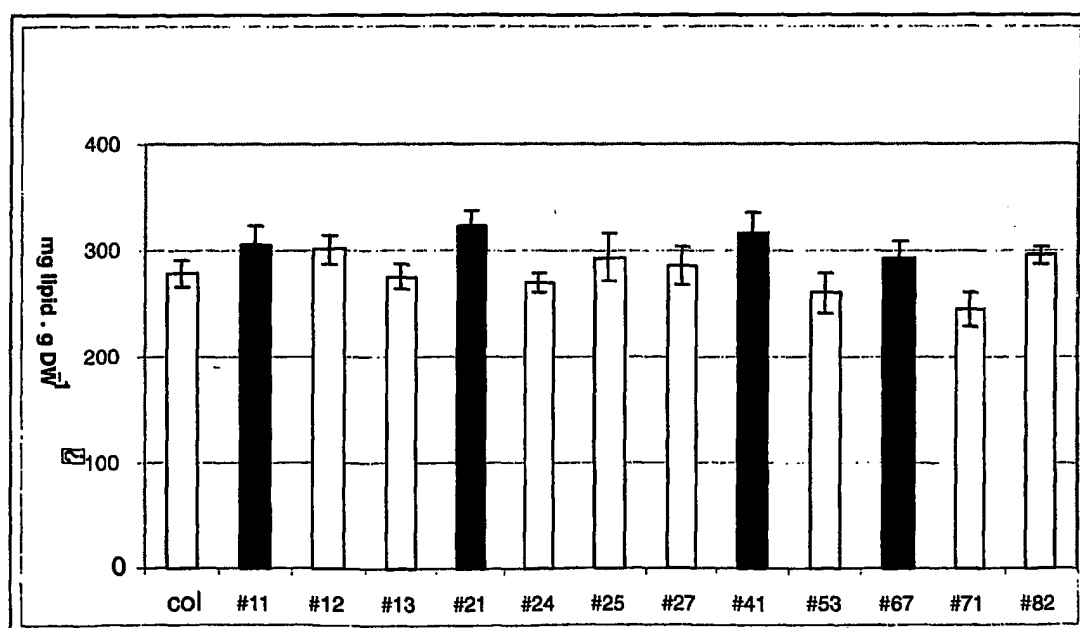


Fig. 2

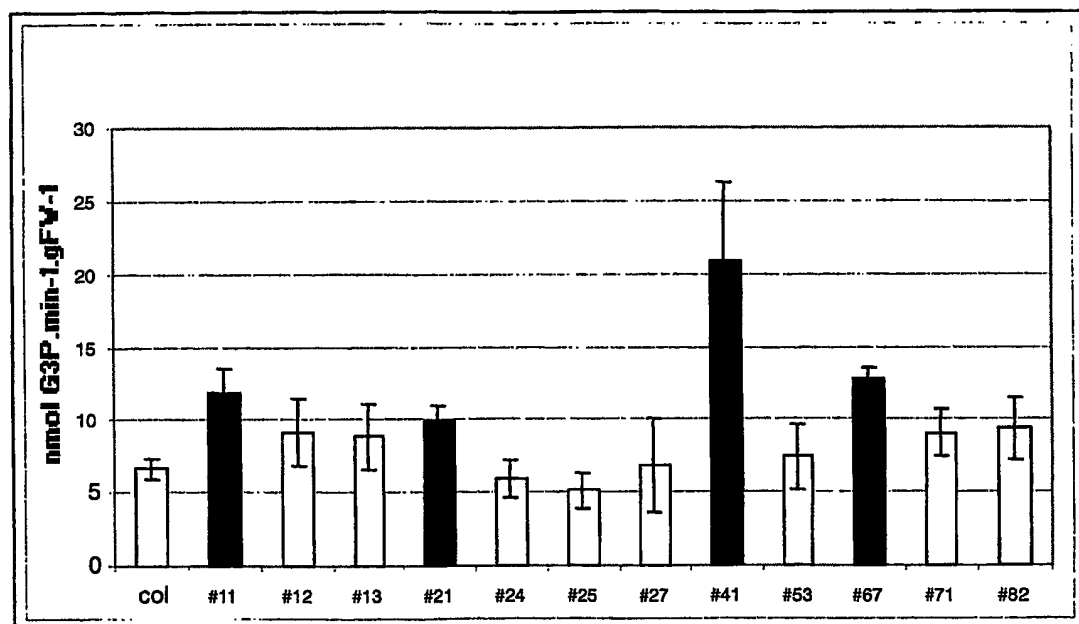


Fig. 3



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Plant Science GmbH

&lt;120&gt; Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen

&lt;130&gt; NAE 2166/2002

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 40

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1176

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1173)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 1

atg tct gct gct gct gat aga tta aac tta act tcc ggc cac ttg aat	48
Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn	
1 5 10 15	
gct ggt aga aag aga agt tcc tct tct gtt tct ttg aag gct gcc gaa	96
Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu	
20 25 30	
aag cct ttc aag gtt act gtg att gga tct ggt aac tgg ggt act act	144
Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr	
35 40 45	
att gcc aag gtg gtt gcc gaa aat tgt aag gga tac cca gaa gtt ttc	192
Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe	
50 55 60	
gct cca ata gta caa atg tgg gtg ttc gaa gaa gag atc aat ggt gaa	240
Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu	
65 70 75 80	
aaa ttg act gaa atc ata aat act aga cat caa aac gtg aaa tac ttg	288
Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu	
85 90 95	
cct ggc atc act cta ccc gac aat ttg gtt gct aat cca gac ttg att	336
Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile	
100 105 110	
gat tca gtc aag gat gtc gac atc atc gtt ttc aac att cca cat caa	384
Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln	
115 120 125	
ttt ttg ccc cgt atc tgt agc caa ttg aaa ggt cat gtt gat tca cac	432
Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His	
130 135 140	
gtc aga gct atc tcc tgt cta aag ggt ttt gaa gtt ggt gct aaa ggt	480
Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly	
145 150 155 160	
gtc caa ttg cta tcc tct tac atc act gag gaa cta ggt att caa tgt	528
Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys	
165 170 175	

ggt gct cta tct ggt gct aac att gcc acc gaa gtc gct caa gaa cac 576  
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His  
 180 185 190

tgg tct gaa aca aca gtt gct tac cac att cca aag gat ttc aga ggc 624  
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly  
 195 200 205

gag ggc aag gac gtc gac cat aag gtt cta aag gcc ttg ttc cac aga 672  
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg  
 210 215 220

cct tac ttc cac gtt agt gtc atc gaa gat gtt gct ggt atc tcc atc 720  
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile  
 225 230 235 240

tgt ggt gct ttg aag aac gtt gtt gcc tta ggt tgt ggt ttc gtc gaa 768  
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu  
 245 250 255

ggt cta ggc tgg ggt aac aac gct tct gct gcc atc caa aga gtc ggt 816  
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly  
 260 265 270

ttg ggt gag atc atc aga ttc ggt caa atg ttt ttc cca gaa tct aga 864  
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg  
 275 280 285

gaa gaa aca tac tac caa gag tct gct ggt gtt gct gat ttg atc acc 912  
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr  
 290 295 300

acc tgc gct ggt ggt aga aac gtc aag gtt gct agg cta atg gct act 960  
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr  
 305 310 315 320

tct ggt aag gac gcc tgg gaa tgt gaa aag gag ttg ttg aat ggc caa 1008  
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln  
 325 330 335

tcc gct caa ggt tta att acc tgc aaa gaa gtt cac gaa tgg ttg gaa 1056  
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu  
 340 345 350

aca tgt ggc tct gtc gaa gac ttc cca tta ttt gaa gcc gta tac caa 1104  
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln  
 355 360 365

atc gtt tac aac aac tac cca atg aag aac ctg ccg gac atg att gaa 1152  
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu  
 370 375 380

gaa tta gat cta cat gaa gat tag 1176  
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp  
 385 390

<210> 2  
 <211> 391  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 2  
 Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu  
 20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr  
 35 40 45  
 Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe  
 50 55 60  
 Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu  
 85 90 95  
 Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile  
 100 105 110  
 Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln  
 115 120 125  
 Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His  
 130 135 140  
 Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys  
 165 170 175  
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His  
 180 185 190  
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly  
 195 200 205  
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg  
 210 215 220  
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile  
 225 230 235 240  
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu  
 245 250 255  
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly  
 260 265 270  
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg  
 275 280 285  
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr  
 290 295 300  
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln  
 325 330 335  
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu  
 340 345 350  
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln  
 355 360 365  
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu  
 370 375 380  
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp  
 385 390

```

<210> 3
<211> 1299
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1296)
<223> coding for G3PDH

<220>
<221> CDS
<222> (145)..(1296)
<223> coding for G3PDH (alternative Start codon)

<400> 3
atg ctt gct gtc aga aga tta aca aga tac aca ttc ctt aag cga acg      48
Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr
   1             5             10             15

cat ccg gtg tta tat act cgt cgt gca tat aaa att ttg cct tca aga      96
His Pro Val Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Tyr Lys Ile Leu Pro Ser Arg
             20             25             30

tct act ttc cta aga aga tca tta tta caa aca caa ctg cac tca aag     144
Ser Thr Phe Leu Arg Arg Ser Leu Leu Gln Thr Gln Leu His Ser Lys
             35             40             45

atg act gct cat act aat atc aaa cag cac aaa cac tgt cat gag gac     192
Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp
             50             55             60

cat cct atc aga aga tcg gac tct gcc gtg tca att gta cat ttg aaa     240
His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys
             65             70             75             80

cgt gcg ccc ttc aag gtt aca gtg att ggt tct ggt aac tgg ggg acc     288
Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr
             85             90             95

acc atc gcc aaa gtc att gcg gaa aac aca gaa ttg cat tcc cat atc     336
Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile
             100            105            110

ttc gag cca gag gtg aga atg tgg gtt ttt gat gaa aag atc ggc gac     384
Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp
             115            120            125

gaa aat ctg acg gat atc ata aat aca aga cac cag aac gtt aaa tat     432
Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
             130            135            140

cta ccc aat att gac ctg ccc cat aat cta gtg gcc gat cct gat ctt     480
Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
             145            150            155            160

tta cac tcc atc aag ggt gct gac atc ctt gtt ttc aac atc cct cat     528
Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
             165            170            175

caa ttt tta cca aac ata gtc aaa caa ttg caa ggc cac gtg gcc cct     576
Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
             180            185            190

cat gta agg gcc atc tcg tgt cta aaa ggg ttc gag ttg ggc tcc aag     624
His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
             195            200            205

```

5

ggt gtg caa ttg cta tcc tcc tat gtt act gat gag tta gga atc caa 672  
 Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln  
 210 215 220

tgt ggc gca cta tct ggt gca aac ttg gca ccg gaa gtg gcc aag gag 720  
 Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu  
 225 230 235 240

cat tgg tcc gaa acc acc gtg gct tac caa cta cca aag gat tat caa 768  
 His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln  
 245 250 255

ggt gat ggc aag gat gta gat cat aag att ttg aaa ttg ctg ttc cac 816  
 Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His  
 260 265 270

aga cct tac ttc cac gtc aat gtc atc gat gat gtt gct ggt ata tcc 864  
 Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser  
 275 280 285

att gcc ggt gcc ttg aag aac gtc gtg gca ctt gca tgt ggt ttc gta 912  
 Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val  
 290 295 300

gaa ggt atg gga tgg ggt aac aat gcc tcc gca gcc att caa agg ctg 960  
 Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu  
 305 310 315 320

ggt tta ggt gaa att atc aag ttc ggt aga atg ttt ttc cca gaa tcc 1008  
 Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser  
 325 330 335

aaa gtc gag acc tac tat caa gaa tcc gct ggt gtt gca gat ctg atc 1056  
 Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile  
 340 345 350

acc acc tgc tca ggc ggt aga aac gtc aag gtt gcc aca tac atg gcc 1104  
 Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala  
 355 360 365

aag acc ggt aag tca gcc ttg gaa gca gaa aag gaa ttg ctt aac ggt 1152  
 Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly  
 370 375 380

caa tcc gcc caa ggg ata atc aca tgc aga gaa gtt cac gag tgg cta 1200  
 Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu  
 385 390 395 400

caa aca tgt gag ttg acc caa gaa ttc cca att att cga ggc agt cta 1248  
 Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu  
 405 410 415

cca gat agt cta caa caa cgt ccg cat gga aga cct acc gga gat gat 1296  
 Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp  
 420 425 430

tga 1299

<210> 4  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 4  
 Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr  
 1 5 10 15

His	Pro	Val	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Tyr	Lys	Ile	Leu	Pro	Ser	Arg
			20					25					30		
Ser	Thr	Phe	Leu	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Thr	Gln	Leu	His	Ser	Lys
		35					40					45			
Met	Thr	Ala	His	Thr	Asn	Ile	Lys	Gln	His	Lys	His	Cys	His	Glu	Asp
	50					55					60				
His	Pro	Ile	Arg	Arg	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Ser	Ile	Val	His	Leu	Lys
65					70					75					80
Arg	Ala	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr
				85					90					95	
Thr	Ile	Ala	Lys	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Thr	Glu	Leu	His	Ser	His	Ile
			100					105					110		
Phe	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Met	Trp	Val	Phe	Asp	Glu	Lys	Ile	Gly	Asp
		115					120					125			
Glu	Asn	Leu	Thr	Asp	Ile	Ile	Asn	Thr	Arg	His	Gln	Asn	Val	Lys	Tyr
	130					135					140				
Leu	Pro	Asn	Ile	Asp	Leu	Pro	His	Asn	Leu	Val	Ala	Asp	Pro	Asp	Leu
145					150					155					160
Leu	His	Ser	Ile	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	His
				165					170					175	
Gln	Phe	Leu	Pro	Asn	Ile	Val	Lys	Gln	Leu	Gln	Gly	His	Val	Ala	Pro
			180					185					190		
His	Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Leu	Gly	Ser	Lys
		195					200					205			
Gly	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Val	Thr	Asp	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln
	210					215					220				
Cys	Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Lys	Glu
225					230					235					240
His	Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Tyr	Gln
				245					250					255	
Gly	Asp	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Ile	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	His
			260					265					270		
Arg	Pro	Tyr	Phe	His	Val	Asn	Val	Ile	Asp	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser
		275					280					285			
Ile	Ala	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Gly	Phe	Val
	290					295					300				
Glu	Gly	Met	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Arg	Leu
305					310					315					320
Gly	Leu	Gly	Glu	Ile	Ile	Lys	Phe	Gly	Arg	Met	Phe	Phe	Pro	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Val	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile
			340					345					350		
Thr	Thr	Cys	Ser	Gly	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Thr	Tyr	Met	Ala
		355					360					365			
Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala</										

```
<210> 5
<211> 384
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
```

&lt;400&gt; 5

```

Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp
 1          5          10          15
His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys
          20          25          30
Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr
          35          40          45
Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile
          50          55          60
Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp
          65          70          75          80
Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
          85          90          95
Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
          100          105          110
Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
          115          120          125
Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
          130          135          140
His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
          145          150          155          160
Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln
          165          170          175
Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu
          180          185          190
His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln
          195          200          205
Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His
          210          215          220
Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser
          225          230          235          240
Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val
          245          250          255
Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu
          260          265          270
Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser
          275          280          285
Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile
          290          295          300
Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala
          305          310          315          320
Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly
          325          330          335
Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu
          340          345          350
Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu
          355          360          365
Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp
          370          375          380

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1122

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Schizosaccharomyces pombe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1119)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 6

atg act gtg gct gct ttg aac aaa ctc agc gct ctc tcc gga agt att	48
Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Lys Leu Ser Ala Leu Ser Gly Ser Ile	
1 5 10 15	
caa aaa tct ttt tca cct aaa ctt att tct gtt ggt atc atc gga tca	96
Gln Lys Ser Phe Ser Pro Lys Leu Ile Ser Val Gly Ile Ile Gly Ser	
20 25 30	
gga aat tgg gga acc gct att gct aaa ata tgt ggt gaa aat gcc aag	144
Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Lys	
35 40 45	
gct cat cct gat att ttc cat cct caa gta cac atg tgg atg tat gaa	192
Ala His Pro Asp Ile Phe His Pro Gln Val His Met Trp Met Tyr Glu	
50 55 60	
gag aag att caa cat gag gga aaa gag tgc aat ctc acg gaa gtt ttt	240
Glu Lys Ile Gln His Glu Gly Lys Glu Cys Asn Leu Thr Glu Val Phe	
65 70 75 80	
aac act act cat gaa aac gtt aaa tat ctc aaa ggt atc aaa tgc cct	288
Asn Thr Thr His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Cys Pro	
85 90 95	
tct aac gtc ttc gca aac ccg gac att cgt gat gta ggt tca cgt agc	336
Ser Asn Val Phe Ala Asn Pro Asp Ile Arg Asp Val Gly Ser Arg Ser	
100 105 110	
gac att ctg gta tgg gtt ctc cct cac cag ttc gtt gtg cgt att tgc	384
Asp Ile Leu Val Trp Val Leu Pro His Gln Phe Val Val Arg Ile Cys	
115 120 125	
aat caa ttg aag gga tgc cta aag aag gat gct gtt gca att tca tgc	432
Asn Gln Leu Lys Gly Cys Leu Lys Lys Asp Ala Val Ala Ile Ser Cys	
130 135 140	
atc aaa ggt gta tct gtc acc aag gac cgt gtt cgc ctc ttt tct gat	480
Ile Lys Gly Val Ser Val Thr Lys Asp Arg Val Arg Leu Phe Ser Asp	
145 150 155 160	
att atc gaa gaa aac acg gga atg tat tgt ggc gtt ctc tct ggc gcc	528
Ile Ile Glu Glu Asn Thr Gly Met Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala	
165 170 175	
aac att gcc agc gaa gtt gct caa gag aag ttt tgc gaa act act atc	576
Asn Ile Ala Ser Glu Val Ala Gln Glu Lys Phe Cys Glu Thr Thr Ile	
180 185 190	
gga tat ttg cct aat agt tct gtt aat ccc cgc tat act cct aag act	624
Gly Tyr Leu Pro Asn Ser Ser Val Asn Pro Arg Tyr Thr Pro Lys Thr	
195 200 205	
atc caa gct ttg ttt aac cgt ccc tac ttc cgt gtc aac att gtt gag	672
Ile Gln Ala Leu Phe Asn Arg Pro Tyr Phe Arg Val Asn Ile Val Glu	
210 215 220	
gat gtt cct ggt gtt gct ttg ggc ggt gca ctc aag aat atc gtc gct	720
Asp Val Pro Gly Val Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala	
225 230 235 240	
gtc gct gcc ggt att att gat gga ctt gaa ttg gga gat aat acc aaa	768
Val Ala Ala Gly Ile Ile Asp Gly Leu Glu Leu Gly Asp Asn Thr Lys	
245 250 255	



tct gct gtt atg cgc att ggc ctt ctg gaa atg cag aaa ttc ggc agg	816
Ser Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Gly Arg	
260 265 270	
atg ttt ttc gat tgt aag cct ctt act atg agc gag gaa tct tgt ggc	864
Met Phe Phe Asp Cys Lys Pro Leu Thr Met Ser Glu Glu Ser Cys Gly	
275 280 285	
ata gcc gat tta att aca act tgc tta ggc ggc cgt aac cac aaa tgc	912
Ile Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Leu Gly Gly Arg Asn His Lys Cys	
290 295 300	
gct gtg gca ttt gtc aag aca gga aag ccc atg cat gtt gtt gaa caa	960
Ala Val Ala Phe Val Lys Thr Gly Lys Pro Met His Val Val Glu Gln	
305 310 315 320	
gaa ctt ctt gat ggt cag aag ttg caa ggt gca gct acc gcg aag gag	1008
Glu Leu Leu Asp Gly Gln Lys Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ala Lys Glu	
325 330 335	
gtt tat gag ttc ctt gat aac cag aat aag gta agc gaa ttc cca ttg	1056
Val Tyr Glu Phe Leu Asp Asn Gln Asn Lys Val Ser Glu Phe Pro Leu	
340 345 350	
ttt aca gct gtt tat cgc att gtt tat gag gga ctt cca cct aat aag	1104
Phe Thr Ala Val Tyr Arg Ile Val Tyr Glu Gly Leu Pro Pro Asn Lys	
355 360 365	
ctt ctg gag gct att taa	1122
Leu Leu Glu Ala Ile	
370	
<210> 7	
<211> 373	
<212> PRT	
<213> Schizosaccharomyces pombe	
<400> 7	
Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Lys Leu Ser Ala Leu Ser Gly Ser Ile	
1 5 10 15	
Gln Lys Ser Phe Ser Pro Lys Leu Ile Ser Val Gly Ile Ile Gly Ser	
20 25 30	
Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Lys	
35 40 45	
Ala His Pro Asp Ile Phe His Pro Gln Val His Met Trp Met Tyr Glu	
50 55 60	
Glu Lys Ile Gln His Glu Gly Lys Glu Cys Asn Leu Thr Glu Val Phe	
65 70 75 80	
Asn Thr Thr His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Cys Pro	
85 90 95	
Ser Asn Val Phe Ala Asn Pro Asp Ile Arg Asp Val Gly Ser Arg Ser	
100 105 110	
Asp Ile Leu Val Trp Val Leu Pro His Gln Phe Val Val Arg Ile Cys	
115 120 125	
Asn Gln Leu Lys Gly Cys Leu Lys Lys Asp Ala Val Ala Ile Ser Cys	
130 135 140	
Ile Lys Gly Val Ser Val Thr Lys Asp Arg Val Arg Leu Phe Ser Asp	
145 150 155 160	

## 10

```

Ile Ile Glu Glu Asn Thr Gly Met Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala
      165                      170                      175
Asn Ile Ala Ser Glu Val Ala Gln Glu Lys Phe Cys Glu Thr Thr Ile
      180                      185                      190
Gly Tyr Leu Pro Asn Ser Ser Val Asn Pro Arg Tyr Thr Pro Lys Thr
      195                      200                      205
Ile Gln Ala Leu Phe Asn Arg Pro Tyr Phe Arg Val Asn Ile Val Glu
      210                      215                      220
Asp Val Pro Gly Val Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala
      225                      230                      235                      240
Val Ala Ala Gly Ile Ile Asp Gly Leu Glu Leu Gly Asp Asn Thr Lys
      245                      250                      255
Ser Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Gly Arg
      260                      265                      270
Met Phe Phe Asp Cys Lys Pro Leu Thr Met Ser Glu Glu Ser Cys Gly
      275                      280                      285
Ile Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Leu Gly Gly Arg Asn His Lys Cys
      290                      295                      300
Ala Val Ala Phe Val Lys Thr Gly Lys Pro Met His Val Val Glu Gln
      305                      310                      315                      320
Glu Leu Leu Asp Gly Gln Lys Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ala Lys Glu
      325                      330                      335
Val Tyr Glu Phe Leu Asp Asn Gln Asn Lys Val Ser Glu Phe Pro Leu
      340                      345                      350
Phe Thr Ala Val Tyr Arg Ile Val Tyr Glu Gly Leu Pro Pro Asn Lys
      355                      360                      365
Leu Leu Glu Ala Ile
      370

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1155

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Schizosaccharomyces pombe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1152)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 8

```

atg tct gga tat ggt caa caa ggt gtt tct gct gcc aac atc gac agc      48
Met Ser Gly Tyr Gly Gln Gln Gly Val Ser Ala Ala Asn Ile Asp Ser
  1                      5                      10                      15
atc cgc ccc aag aaa cgt ttg tca att ggt gta gtt ggc tcc ggt aac      96
Ile Arg Pro Lys Lys Arg Leu Ser Ile Gly Val Val Gly Ser Gly Asn
      20                      25                      30
tgg ggt act gcc att gcc aag att tgc ggt gaa aat gcc cgt gcc cac      144
Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Arg Ala His
      35                      40                      45
ggg cac cat ttc aga ggt aag ggg cgc atg tgg gtc ttt gag gag gag      192
Gly His His Phe Arg Gly Lys Gly Arg Met Trp Val Phe Glu Glu Glu
      50                      55                      60

```

att gag tac aag ggt gag aag aga aag ctc acc gaa gta ttc aac gaa	240
Ile Glu Tyr Lys Gly Glu Lys Arg Lys Leu Thr Glu Val Phe Asn Glu	
65 70 75 80	
gct cac gag aat gtc aaa tac tta ccc ggc atc gaa tgc cct ccc aac	288
Ala His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Glu Cys Pro Pro Asn	
85 90 95	
gtt att gcc gtc ccc gat gtt cgt gag gtc gct aga cgt gcc gac atc	336
Val Ile Ala Val Pro Asp Val Arg Glu Val Ala Arg Arg Ala Asp Ile	
100 105 110	
ctt gtc ttt gtc gtt cct cat caa ttt att gaa cgc gtt tgg cac caa	384
Leu Val Phe Val Val Pro His Gln Phe Ile Glu Arg Val Trp His Gln	
115 120 125	
atg gtc ggt ctc att cgc cct ggt gcc gtt ggt att tcc tgt atc aag	432
Met Val Gly Leu Ile Arg Pro Gly Ala Val Gly Ile Ser Cys Ile Lys	
130 135 140	
ggt gtt gct gtc agc aag gaa ggc tcg ctt tac tct gag gtt atc agc	480
Gly Val Ala Val Ser Lys Glu Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Val Ile Ser	
145 150 155 160	
gag aaa ctc ggt att tac tgt ggt gtt ctt tct ggt gct aac gtt gca	528
Glu Lys Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Val Ala	
165 170 175	
aac gaa gtt gcc cgt gag caa ttc tgt gag act act att ggt ttc aac	576
Asn Glu Val Ala Arg Glu Gln Phe Cys Glu Thr Thr Ile Gly Phe Asn	
180 185 190	
cct cct aat gaa gtt gat atc cct cgc gag caa atc gcc gcc gtc tct	624
Pro Pro Asn Glu Val Asp Ile Pro Arg Glu Gln Ile Ala Ala Val Ser	
195 200 205	
gat cgc cct tac ttc tca gtt gtc tcc gtt gac gac gtt gcc ggt gtc	672
Asp Arg Pro Tyr Phe Ser Val Val Ser Val Asp Asp Val Ala Gly Val	
210 215 220	
gcc ttg ggt ggt gct ttg aag aac gta gtt gcc atg gcc gtt ggt ttc	720
Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Met Ala Val Gly Phe	
225 230 235 240	
gct gat ggt ttg gaa tgg ggc ggt aat acc aag gcc gct att atg cgt	768
Ala Asp Gly Leu Glu Trp Gly Gly Asn Thr Lys Ala Ala Ile Met Arg	
245 250 255	
cgt ggt ttg ttg gag atg caa aag ttt gct act acc ttc ttc gac tct	816
Arg Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Ala Thr Thr Phe Phe Asp Ser	
260 265 270	
gat cct cgt acc atg gtt gag caa tct tgc ggt atc gct gac ttg gtc	864
Asp Pro Arg Thr Met Val Glu Gln Ser Cys Gly Ile Ala Asp Leu Val	
275 280 285	
act tct tgt ttg ggt ggc cgt aac aat cgt tgt gct gaa gca ttt gtc	912
Thr Ser Cys Leu Gly Gly Arg Asn Asn Arg Cys Ala Glu Ala Phe Val	
290 295 300	
aag act ggt aaa tct tta gag acg ctt gaa aaa gag ctc tta ggt ggt	960
Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Leu Gly Gly	
305 310 315 320	
caa ctt ctt caa gga gct gcc act tcc aag gat gtt cat gaa ttc ctt	1008
Gln Leu Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ser Lys Asp Val His Glu Phe Leu	
325 330 335	

```
<210> 9
<211> 384
<212> PRT
<213> Schizosaccharomyces pombe
```

<400> 9															
Met 1	Ser	Gly	Tyr	Gly 5	Gln	Gln	Gly	Val	Ser 10	Ala	Ala	Asn	Ile	Asp 15	Ser
Ile	Arg	Pro	Lys 20	Lys	Arg	Leu	Ser	Ile 25	Gly	Val	Val	Gly	Ser 30	Gly	Asn
Trp	Gly 35	Thr	Ala	Ile	Ala	Lys	Ile 40	Cys	Gly	Glu	Asn	Ala 45	Arg	Ala	His
Gly	His 50	His	Phe	Arg	Gly	Lys 55	Gly	Arg	Met	Trp	Val 60	Phe	Glu	Glu	Glu
Ile 65	Glu	Tyr	Lys	Gly 70	Glu	Lys	Arg	Lys	Leu	Thr 75	Glu	Val	Phe	Asn	Glu 80
Ala	His	Glu	Asn	Val 85	Lys	Tyr	Leu	Pro	Gly 90	Ile	Glu	Cys	Pro	Pro 95	Asn
Val	Ile	Ala	Val 100	Pro	Asp	Val	Arg	Glu 105	Val	Ala	Arg	Arg	Ala 110	Asp	Ile
Leu	Val 115	Phe	Val	Val	Pro	His	Gln 120	Phe	Ile	Glu	Arg 125	Val	Trp	His	Gln
Met 130	Val	Gly	Leu	Ile	Arg	Pro 135	Gly	Ala	Val	Gly	Ile 140	Ser	Cys	Ile	Lys
Gly 145	Val	Ala	Val	Ser	Lys 150	Glu	Gly	Ser	Leu	Tyr 155	Ser	Glu	Val	Ile	Ser 160
Glu	Lys	Leu	Gly 165	Ile	Tyr	Cys	Gly	Val 170	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Val 175	Ala
Asn	Glu	Val 180	Ala	Arg	Glu	Gln	Phe 185	Cys	Glu	Thr	Thr	Ile	Gly 190	Phe	Asn
Pro	Pro	Asn 195	Glu	Val	Asp	Ile	Pro 200	Arg	Glu	Gln	Ile	Ala 205	Ala	Val	Ser
Asp 210	Arg	Pro	Tyr	Phe	Ser	Val 215	Val	Ser	Val	Asp	Asp 220	Val	Ala	Gly	Val
Ala 225	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu 230	Lys	Asn	Val	Val	Ala 235	Met	Ala	Val	Gly	Phe 240
Ala	Asp	Gly	Leu 245	Glu	Trp	Gly	Gly	Asn	Thr 250	Lys	Ala	Ala	Ile	Met 255	Arg
Arg	Gly	Leu 260	Leu	Glu	Met	Gln	Lys 265	Phe	Ala	Thr	Thr	Phe	Phe 270	Asp	Ser

Asp Pro Arg Thr Met Val Glu Gln Ser Cys Gly Ile Ala Asp Leu Val  
 275 280 285  
 Thr Ser Cys Leu Gly Gly Arg Asn Asn Arg Cys Ala Glu Ala Phe Val  
 290 295 300  
 Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Leu Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Leu Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ser Lys Asp Val His Glu Phe Leu  
 325 330 335  
 Leu Thr Lys Asp Met Val Lys Asp Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr  
 340 345 350  
 Asn Ile Ser Tyr Glu Asp Met Asp Pro Lys Asp Leu Ile Ile Val Leu  
 355 360 365  
 Gln Pro Leu Lys Glu Asp Ser Glu Asn Glu Gly Gly Thr Glu Thr Glu  
 370 375 380

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1197

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Yarrowia lipolytica

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1194)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (40)..(1194)

&lt;400&gt; 10

atg agc gct cta ctt aga tcg tcc ctg cgt ttt aaa cac atg tcc gcc	48
Met Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ser Leu Arg Phe Lys His Met Ser Ala	
1 5 10 15	
gtc aac cgt ctc aca caa cag ctt cga ctg ctg acc gcc tcc gcg cct	96
Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ser Ala Pro	
20 25 30	
ctc agc gca gcc aac acc gcc ggc aag gct cct ttc aag gtc gcc gtt	144
Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys Val Ala Val	
35 40 45	
gtt ggt tct ggt aac tgg gga acc acc gtc gcc aag att gtc gcc gag	192
Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile Val Ala Glu	
50 55 60	
aac tgc act gct cac ccc gag ctc ttt gag ccc gag gtt cga gtc tgg	240
Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val Arg Val Trp	
65 70 75 80	
gtt cga gaa gag aag gtc aac ggc aag aac ctg acc gac att ttc aac	288
Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp Ile Phe Asn	
85 90 95	
gct gag cac gag aac gtg cga tac ctc cct aaa atc aaa ctt cct cac	336
Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Leu Pro His	
100 105 110	
aac ctg atc gcc gag ccg gat ctg ctc aag gcc gtc gag ggt gcc aac	384
Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu Gly Ala Asn	
115 120 125	

atc	atc	gtc	ttc	aac	ctg	ccc	cat	cag	ttc	ctg	gct	ggc	gtc	tgc	aag	432
Ile	Ile	Val	Phe	Asn	Leu	Pro	His	Gln	Phe	Leu	Ala	Gly	Val	Cys	Lys	
130						135					140					
cag	ctc	aag	ggc	cac	gtc	aac	ccc	aag	gct	aga	gcc	atc	tcc	tgc	ctc	480
Gln	Leu	Lys	Gly	His	Val	Asn	Pro	Lys	Ala	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	
145					150					155					160	
aag	ggc	cta	gat	gtc	acc	ccc	cag	ggc	gtt	tac	ctg	ctc	tcc	gac	gtt	528
Lys	Gly	Leu	Asp	Val	Thr	Pro	Gln	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	
				165					170						175	
atc	gag	aac	gag	acc	ggc	ctc	cac	tgc	ggc	gtt	ctg	tcc	ggc	gct	aac	576
Ile	Glu	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	His	Cys	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	
			180					185					190			
ctc	gcc	acc	gag	atc	gct	ctg	gag	aag	tac	tcc	gag	act	acc	gtt	gct	624
Leu	Ala	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	
		195					200					205				
tac	aac	cga	ccc	aag	gac	ttc	ttt	ggc	gag	ggc	gat	gtg	acc	aac	gat	672
Tyr	Asn	Arg	Pro	Lys	Asp	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Thr	Asn	Asp	
	210					215					220					
gtg	ctc	aag	gct	ctg	ttc	cac	cga	ccc	tac	ttc	cat	gtg	cga	tgc	gtt	720
Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	Pro	Tyr	Phe	His	Val	Arg	Cys	Val	
225					230					235					240	
cag	gac	gtc	gcc	ggc	gtc	tcc	atc	gga	ggc	gcc	ctt	aag	aac	gtt	gtt	768
Gln	Asp	Val	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val	
			245					250						255		
gcc	ctt	tgc	gcc	ggc	ttc	gtc	gag	ggc	aag	aac	tgg	gga	gac	aac	gcc	816
Ala	Leu	Cys	Ala	Gly	Phe	Val	Glu	Gly	Lys	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Ala	
			260					265					270			
aag	gcc	gca	att	atg	cga	cga	ggc	atg	ctt	gag	atg	atc	aac	ttc	tcc	864
Lys	Ala	Ala	Ile	Met	Arg	Arg	Gly	Met	Leu	Glu	Met	Ile	Asn	Phe	Ser	
		275					280					285				
aag	cga	ttc	ttc	ccc	gaa	act	gat	att	aac	act	ctt	aca	gtc	gag	tct	912
Lys	Arg	Phe	Phe	Pro	Glu	Thr	Asp	Ile	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Glu	Ser	
	290					295					300					
gcc	ggc	gtg	gcc	gat	ctc	atc	acc	tgc	tgc	gct	gga	ggc	cga	aac	ttc	960
Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr	Ser	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Phe	
305					310					315					320	
aag	gtc	ggc	cga	gca	ttc	gga	aag	gag	agc	ggc	tcc	ggc	aag	acc	atc	1008
Lys	Val	Gly	Arg	Ala	Phe	Gly	Lys	Glu	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	
			325					330					335			
cag	gac	gtg	gag	aag	gag	ctt	ctc	aac	ggc	cag	tcc	gcc	cag	ggc	gtc	1056
Gln	Asp	Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	Ser	Ala	Gln	Gly	Val	
		340						345					350			
atc	aca	tgt	aac	gag	gtc	cac	gag	ctg	ctc	aag	aac	aag	aac	atg	cag	1104
Ile	Thr	Cys	Asn	Glu	Val	His	Glu	Leu	Leu	Lys	Asn	Lys	Asn	Met	Gln	
		355					360					365				
aag	gac	ttc	cct	ctg	ttc	gag	tcc	acc	tgg	ggc	att	atc	cac	ggc	gag	1152
Lys	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ser	Thr	Trp	Gly	Ile	Ile	His	Gly	Glu	
	370					375				380						
ctc	aag	att	gat	gat	ctc	ccc	gag	att	ctt	tac	cac	gcc	aac	tag		1197
Leu	Lys	Ile	Asp	Asp	Leu	Pro	Glu	Ile	Leu	Tyr	His	Ala	Asn			
385					390					395						

<210> 11  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> Yarrowia lipolytica

<400> 11

Met	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	His	Met	Ser	Ala
1				5					10					15	
Val	Asn	Arg	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Arg	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Ala	Pro
			20					25					30		
Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Thr	Ala	Gly	Lys	Ala	Pro	Phe	Lys	Val	Ala	Val
		35					40					45			
Val	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Lys	Ile	Val	Ala	Glu
	50					55					60				
Asn	Cys	Thr	Ala	His	Pro	Glu	Leu	Phe	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Val	Trp
65					70				75						80
Val	Arg	Glu	Glu	Lys	Val	Asn	Gly	Lys	Asn	Leu	Thr	Asp	Ile	Phe	Asn
				85					90					95	
Ala	Glu	His	Glu	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Lys	Leu	Pro	His
			100					105					110		
Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Glu	Gly	Ala	Asn
	115						120					125			
Ile	Ile	Val	Phe	Asn	Leu	Pro	His	Gln	Phe	Leu	Ala	Gly	Val	Cys	Lys
	130					135					140				
Gln	Leu	Lys	Gly	His	Val	Asn	Pro	Lys	Ala	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu
145					150				155						160
Lys	Gly	Leu	Asp	Val	Thr	Pro	Gln	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Ser	Asp	Val
			165					170						175	
Ile	Glu	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu	His	Cys	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn
		180						185					190		
Leu	Ala	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala
	195						200					205			
Tyr	Asn	Arg	Pro	Lys	Asp	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Thr	Asn	Asp
	210					215					220				
Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	Pro	Tyr	Phe	His	Val	Arg	Cys	Val
225					230					235					240
Gln	Asp	Val	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Val
			245					250						255	
Ala	Leu	Cys	Ala	Gly	Phe	Val	Glu	Gly	Lys	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Ala
		260						265					270		
Lys	Ala	Ala	Ile	Met	Arg	Arg	Gly	Met	Leu	Glu	Met	Ile	Asn	Phe	Ser
	275						280					285			
Lys	Arg	Phe	Phe	Pro	Glu	Thr	Asp	Ile	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Glu	Ser
	290					295					300				
Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Leu	Ile	Thr	Ser	Cys	Ala	Gly	Gly	Arg	Asn	Phe
305					310					315					320
Lys	Val	Gly	Arg	Ala	Phe	Gly	Lys	Glu	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile
			325					330						335	
Gln	Asp	Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	Ser	Ala	Gln	Gly	Val
		340						345					350		
Ile	Thr	Cys	Asn	Glu	Val	His	Glu	Leu	Leu	Lys	Asn	Lys	Asn	Met	Gln
	355						360					365			
Lys	Asp	Phe	Pro	Leu	Phe	Glu	Ser	Thr	Trp	Gly	Ile	Ile	His	Gly	Glu
	370					375					380				
Leu	Lys	Ile	Asp	Asp	Leu	Pro	Glu	Ile	Leu	Tyr	His	Ala	Asn		
385					390					395					

[illegible]



<210> 13  
 <211> 1206  
 <212> DNA  
 <213> Zygosaccharomyces rouxii

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1203)  
 <223> coding for G3PDH

<400> 13  
 atg gcc gct act gac aga tta aac caa acc tct gat atc cta tcg caa 48  
 Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser Gln  
 1 5 10 15  
 tct atg aag aag acc gac tca tca atg tca gtc gtt acc gct gag aat 96  
 Ser Met Lys Lys Thr Asp Ser Ser Met Ser Val Val Thr Ala Glu Asn  
 20 25 30  
 cca tac aaa gtt tcc gtc gtc ggc tct ggt aac tgg ggt acc acc atc 144  
 Pro Tyr Lys Val Ser Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile  
 35 40 45  
 gcc aag gtc gtt gcc gaa aac acc aag gaa aag cca gaa ttg ttc caa 192  
 Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln  
 50 55 60  
 gaa cgt gtg gac atg tgg gtg ttt gaa gaa cag atc gac ggt act cca 240  
 Glu Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro  
 65 70 75 80  
 ttg gcc caa atc atc aac acc aag cac cag aac gtg aaa tac ttg cca 288  
 Leu Ala Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro  
 85 90 95  
 aac atc gac ctt ccg gac aat ttg gtc gct aac cca gac ttg att gcc 336  
 Asn Ile Asp Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ala  
 100 105 110  
 acc acg aag gac gcc gat gtg att gtt ttc aac gtt ccc cat caa ttt 384  
 Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe  
 115 120 125  
 ttg ggc cgt atc gtt gct caa atg aag ggt caa atc aaa cca act gca 432  
 Leu Gly Arg Ile Val Ala Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Thr Ala  
 130 135 140  
 cgt gcg gtc tcc tgt cta aag ggt ttc gaa gtt ggt cca aag ggt gtg 480  
 Arg Ala Val Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val  
 145 150 155 160  
 cag ctt cta tct gac tac gtc act caa gaa ttg ggt atc gaa tgt ggt 528  
 Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Glu Cys Gly  
 165 170 175  
 gct cta tct ggt gct aac ttg gcc cca gaa gtc gcc aag gaa cac tgg 576  
 Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp  
 180 185 190  
 tcc gag acc acc gtc gct tac cac atc cca gac gac ttc aag ggt gac 624  
 Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Asp Asp Phe Lys Gly Asp  
 195 200 205  
 ggt aag gac atc gac cac cgt gtc ttg aag cag ttg ttc cac aga cca 672  
 Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro  
 210 215 220

18

tac ttc cac gtg aat gtg att gac gat gtt gct ggt atc tcc atc gca 720  
 Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala  
 225 230 235 240  
 ggt gca ttg aag aac gtg gtc gcc ttg ggt tgc ggt ttc gtt acc ggt 768  
 Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly  
 245 250 255  
 cta ggt tgg ggt aac aac gcc gcc gcc gcc atc caa cgt gtc ggt ttg 816  
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu  
 260 265 270  
 ggt gaa atc atc aag ttc ggt agg atg ttc ttc cca gaa tcc aag gtg 864  
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val  
 275 280 285  
 gag act tac tac caa gaa tcc gca ggt gtt gct gac ttg atc acc acc 912  
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr  
 290 295 300  
 tgt tcc ggt ggt aga aac gtc cgt gtt gcc acc gaa atg gcc aag act 960  
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr  
 305 310 315 320  
 ggt aag agc ggt gag caa gtc gaa aaa gac atc ttg aac ggt caa tcc 1008  
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser  
 325 330 335  
 gct caa ggt ttg gtc acc tgt aag gaa gtt cac cag tgg tta gaa tct 1056  
 Ala Gln Gly Leu Val Thr Cys Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser  
 340 345 350  
 agt gga aac acc gaa gac ttc cca ttg ttc gag gct gtc tac cag atc 1104  
 Ser Gly Asn Thr Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile  
 355 360 365  
 act tac gaa aac gtg ccc atg aag gag ttg cca tct atg atc gaa gaa 1152  
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu  
 370 375 380  
 ttg gat atc gat agc aca tcg aag tgc gta ttg agt tac aag atg ggt 1200  
 Leu Asp Ile Asp Ser Thr Ser Lys Cys Val Leu Ser Tyr Lys Met Gly  
 385 390 395 400  
 ctc tag 1206  
 Leu  
 <210> 14  
 <211> 401  
 <212> PRT  
 <213> Zygosaccharomyces rouxii  
 <400> 14  
 Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Lys Thr Asp Ser Ser Met Ser Val Val Thr Ala Glu Asn  
 20 25 30  
 Pro Tyr Lys Val Ser Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile  
 35 40 45  
 Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln  
 50 55 60  
 Glu Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro  
 65 70 75 80

[illegible]

```
<210> 15
<211> 1170
<212> DNA
<213> Zygosaccharomyces rouxii
```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1167)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 15

atg gcc gcc act gac aga tta aac caa acc tcc gat atc cta tct cat	48
Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser His	
1 5 10 15	
tct atg aag aag act gat acc tca atg tca att gtt acc gct gag aat	96
Ser Met Lys Lys Thr Asp Thr Ser Met Ser Ile Val Thr Ala Glu Asn	
20 25 30	
cct tac aag gtc gct gtt gtc ggt tct ggt aac tgg ggt acc act atc	144
Pro Tyr Lys Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile	
35 40 45	
gct aag gtt gtt gcc gaa aac acc aaa gaa aag cca gag ttg ttc caa	192
Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln	
50 55 60	
gga cgt gtg gac atg tgg gtt ttc gaa gaa caa atc gat ggt act cca	240
Gly Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro	
65 70 75 80	
ttg act caa atc atc aac acc aaa cac caa aac gtc aaa tac ctt cca	288
Leu Thr Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro	
85 90 95	
aac atc gat ctt ccg ggg aat ttg gtc gct aac cca gat ttg atc tct	336
Asn Ile Asp Leu Pro Gly Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ser	
100 105 110	
act acc aag gac gct gat gtc atc gtt ttc aac gtt cct cac caa ttt	384
Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe	
115 120 125	
ttg ggc cgt atc gtt tct caa atg aag ggt caa atc aaa cca gat gct	432
Leu Gly Arg Ile Val Ser Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Asp Ala	
130 135 140	
cgt gcc atc tcc tgt cta aag ggt ttc gaa gtt ggt cca aag ggt gtc	480
Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val	
145 150 155 160	
caa cta ctt tct gac tac gtc act caa gaa tta ggt atc caa tgt ggt	528
Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Gln Cys Gly	
165 170 175	
gcc cta tct ggt gct aac ttg gct cca gaa gtc gcc aag gaa cac tgg	576
Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp	
180 185 190	
tcc gaa act acc gtc gct tac caa gtc cca gat gac ttc aag ggt gaa	624
Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Val Pro Asp Asp Phe Lys Gly Glu	
195 200 205	
ggt aaa gat atc gac cac cgt gtc ttg aaa caa ttg ttc cac aga cca	672
Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro	
210 215 220	
tac ttc cac gtc aat gtg atc gac gat gtt gct ggt att tct atc gca	720
Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala	
225 230 235 240	
ggt gca ttg aag aac gtg gtt gcc ttg ggt tgc ggt ttc gtc acc ggt	768
Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly	
245 250 255	

## 21

cta ggc tgg ggt aac aac gct gcc gcc gcc atc caa cgt gtt ggt ttg 816  
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu  
 260 265 270

ggt gaa atc atc aag ttc ggt aga atg ttc ttc cca gaa tcc aag gtg 864  
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val  
 275 280 285

gaa act tac tac caa gaa tct gca ggt gtt gct gat ttg atc act acc 912  
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr  
 290 295 300

tgt tcc ggt ggt aga aac gtt cgt gtc gcc act gaa atg gcc aag act 960  
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr  
 305 310 315 320

ggt aag agc ggt gaa caa gtc gaa aag gac atc ttg aac ggt caa tcc 1008  
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser  
 325 330 335

gct caa ggt ttg att act gct aag gaa gtc cac caa tgg ttg gaa tcc 1056  
 Ala Gln Gly Leu Ile Thr Ala Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser  
 340 345 350

agc ggt cac acc gaa gaa tac cca ttg ttt gaa gcc gtc tac caa atc 1104  
 Ser Gly His Thr Glu Glu Tyr Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile  
 355 360 365

act tac gaa aac gtg ccc atg aag gag ttg cca tcc atg atc gaa gaa 1152  
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu  
 370 375 380

ttg gat atc gta gaa taa 1170  
 Leu Asp Ile Val Glu  
 385

<210> 16  
 <211> 389  
 <212> PRT  
 <213> Zygosaccharomyces rouxii

<400> 16  
 Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser His  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Lys Thr Asp Thr Ser Met Ser Ile Val Thr Ala Glu Asn  
 20 25 30  
 Pro Tyr Lys Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile  
 35 40 45  
 Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln  
 50 55 60  
 Gly Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro  
 85 90 95  
 Asn Ile Asp Leu Pro Gly Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ser  
 100 105 110  
 Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe  
 115 120 125  
 Leu Gly Arg Ile Val Ser Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Asp Ala  
 130 135 140

22

Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Gln Cys Gly  
 165 170 175  
 Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp  
 180 185 190  
 Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Val Pro Asp Asp Phe Lys Gly Glu  
 195 200 205  
 Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro  
 210 215 220  
 Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly  
 245 250 255  
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu  
 260 265 270  
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val  
 275 280 285  
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr  
 290 295 300  
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser  
 325 330 335  
 Ala Gln Gly Leu Ile Thr Ala Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser  
 340 345 350  
 Ser Gly His Thr Glu Glu Tyr Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile  
 355 360 365  
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ile Val Glu  
 385

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 8809

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: expression  
 vector pSUN-USP containing Saccharomyces G3PDH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1017)..(2189)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 17

aatattcaaa caaacacata cagcgcgact tatcatggac atacaaatgg acgaacggat 60  
 aaaccttttc acgccctttt aaatatccga ttattctaataaacgctctt ttctcttagg 120  
 tttaccgcgc aatatatcct gtcaaacact gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca 180

atcagatcta	gtaggaaaca	gctatgacca	tgattacgcc	aagcttgc	gcctgcaggt	240
cgactctaga	ctagtggatc	cgatatcgcc	cgggctcgag	gtaccgagct	cgaattcggc	300
gcgccgagct	cctcgagcaa	atttacacat	tgccactaaa	cgtctaaacc	cttgtaattt	360
gtttttgttt	tactatgtgt	gttatgtatt	tgatttgcca	taaattttta	tatttggtac	420
taaatttata	acacctttta	tgctaacgtt	tgccaacact	tagcaatttg	caagttgatt	480
aattgattct	aaattatttt	tgtcttctaa	atacatatac	taatcaactg	gaaatgtaaa	540
tatttgctaa	tatttctact	ataggagaat	taaagttagt	gaatatggta	ccacaagggt	600
tggagattta	attgttgcaa	tgatgcatgg	atggcatata	caccaaacad	tcaataattc	660
ttgaggataa	taatgggtacc	acacaagatt	tgagggtgcat	gaacgtcacg	tggacaaaag	720
gttttagtaat	ttttcaagac	aacaatgtta	ccacacacaa	gttttgaggt	gcatgcatgg	780
atgccctgtg	gaaagtttaa	aaatatTTTT	gaaatgattt	gcatggaagc	catgtgtaaa	840
accatgacat	ccacttggag	gatgcaataa	tgaagaaaac	tacaaattta	catgcaacta	900
gttatgcatg	tagtctatat	aatgaggatt	ttgcaatact	ttcattcata	cacactcact	960
aagttttaca	cgattataat	ttcttcatag	ccagccacc	gcggtggcg	gccgccatgt	1020
ctgctgctgc	tgatagatta	aacttaactt	ccggccactt	gaatgctggt	agaaagagaa	1080
gttctctctc	tgtttctttg	aaggctgccg	aaaagccttt	caaggttact	gtgattggat	1140
ctggtaactg	gggtactact	attgccaaagg	tggttgccga	aaattgtgag	ggataccag	1200
aagttttcgc	tccaatagta	caaagtgtgg	tgttcgaaga	agagatcaat	ggtgaaaaat	1260
tgactgaaat	cataaatact	agacatcaaa	acgtgaaata	cttgccctggc	atcactctac	1320
ccgacaattt	ggttgctaata	ccagacttga	ttgattcagt	caaggatgtc	gacatcatcg	1380
tcttcaacat	tccacatcaa	tttttgcccc	gtatctgtag	ccaattgaaa	ggtcatgttg	1440
attcacacgt	cagagctatc	tctgtcttaa	agggttttga	agttggtgct	aaagggtgtc	1500
aattgctatc	ctcttacatc	actgaggaac	taggtattca	atgtggtgct	ctatctggtg	1560
ctaacattgc	cactgaagtc	gctcaagaac	actggtctga	aacaacagtt	gcttaccaca	1620
ttccaaagga	tttcagaggc	gagggcaagg	acgtcgacca	taaggttcta	aaggccttgt	1680
tccacagacc	ttacttccac	gttagtgtca	tcgaagatgt	tgctggtatc	tccatctgtg	1740
gtgctttgaa	gaacgttgtt	gccttaggtt	gtggtttcgt	cgaaggctta	ggctggggta	1800
acaacgcttc	tgctgccatc	caaagagtcg	gtttgggtga	gatcatcaga	ttcgggtcaaa	1860
tgtttttccc	agaatctaga	gaagaaacat	actaccaaga	gtctgctggt	gttgctgatt	1920
tgatcaccac	ctgcgctggg	ggtagaaacg	tcaagggtgc	taggctaattg	gtacttctcg	1980
gtaaggacgc	ctgggaatgt	gaaaaggagt	tgttgaatgg	ccaatccgct	caaggtttaa	2040
ttacctgcaa	agaagttcac	gaatggttgg	aaacatgtgg	ctctgtcgaa	gacttcccat	2100
tatttgaagc	cgtataccaa	atcgtttaca	acaactaccc	aatgaagaac	ctgccggaca	2160
tgattgaaga	attagatcta	catgaagatt	aggcgccgc	ctgcagtcta	gaaggcctcc	2220
tgctttaatg	agatatgcca	gacgcctatg	atcgcatgat	atctgctttc	aattctgttg	2280
tgacggttgt	aaaaaacctg	agcatgtgta	gctcagatcc	ttaccgccgg	tttcggttca	2340
ttctaataaa	tatatcacc	gttactatcg	tatttttatg	aataatattc	tccgttcaat	2400
ttactgattg	tccgtcgacg	aattcactgg	ccgtcgtttt	acaacgactc	agagcttgac	2460
aggaggcccg	atctagtaac	atagatgaca	ccgcgcgcga	taatttatcc	tagtttgccg	2520
gctatatttt	gttttctatc	gcgtattaaa	tgataaattg	cgggactcta	atcataaaaa	2580
cccatctcat	aaataacgtc	atgcattaca	tgtaaatatt	tacatgctta	acgtaattca	2640
acagaaatta	tatgataatc	atcgcaagac	cggcaacagg	attcaatctt	aagaaacttt	2700
attgccaaat	gtttgaacga	tcggggatca	tccgggtctg	tggcgggaac	tccacgaaaa	2760
tatccgaacg	cagcaagatc	tagagcttgg	gtcccgtcta	gaagaactcg	tcaagaaggc	2820
gatagaaggc	gatgcgctgc	gaatcgggag	cggcgatacc	gtaaagcacg	aggaagcggt	2880
cagcccatcc	gccgccaaagc	tcttcagcaa	tatcacgggt	agccaacgct	atgtcctgat	2940
agcggctccg	cacacccagc	cggccacagt	cgatgaatcc	agaaaagcgg	ccattttcca	3000
ccatgatatt	cggcaagcag	gcatcgccat	gtgtcacgac	gagatcctcg	ccgtcgggca	3060
tgcgcgctt	gagcctggcg	aacagttcgg	ctggcgcgag	cccctgatgc	tcttcgtcca	3120
gatcatcctg	atcgacaaga	ccggcttcca	tccgagtacg	tgctcgctcg	atgcgatgtt	3180
tcgcttggtg	gtcgaatggg	caggtagccg	gatcaagcgt	atgcagccgc	cgcattgcat	3240
cagccatgat	ggatactttc	tcggcaggag	caaggtgaga	tgacaggaga	tccgtccccg	3300
gcacttcgcc	caatagcagc	cagtccttcc	ccgcttcagt	gacaacgctg	agcacagctg	3360
cgcaaggaa	gcccgtcggtg	gccagccacg	atagccgcgc	tgccctgctc	tgcagttcat	3420
tcagggcacc	ggacagggtcg	gtcttgacaa	aaagaaccgg	gcgcccctgc	gctgacagcc	3480
ggaacacggc	ggcatcagag	cagccgattg	tctgttgtgc	ccagtcatag	ccgaatagcc	3540
tctccaccca	agcggccgga	gaacctgcgt	gcaatccatc	ttgttcaatc	atgcgaaacg	3600

atccagatcc	ggtgcagatt	atlttgattg	agagtgaata	tgagactcta	attggatacc	3660
gaggggaatt	tatggaacgt	cagtggagca	tttttgacaa	gaaatatttg	ctagctgata	3720
gtgaccttag	gcgacttttg	aacgcgcaat	aatggtttct	gacgtatgtg	cttagctcat	3780
taaactccag	aaacccgcgg	ctgagtggct	ccttcaacgt	tgcggttctg	tcagttccaa	3840
acgtaaaacg	gcttgtcccg	cgtcatcggc	gggggtcata	acgtgactcc	cttaattctc	3900
cgctcatgat	cagattgtcg	tttcccgcct	tcagttttaa	ctatcagtgt	ttgacaggat	3960
caactgttgg	taataattgt	cattagattg	tttttatgca	tagatgcaact	cgaaatcagc	4020
caattttaga	caagtatcaa	acggatgtta	attcagtaca	ttaaagacgt	ccgcaatgtg	4080
ttattaagtt	gtctaagcgt	caatttgttt	acaccacaat	atatacctgcc	accagccagc	4140
caacagctcc	ccgaccggca	gctcggcaca	aaatcaccac	gcgtctaaaa	aggtgatgtg	4200
tatttgagta	aaacagcttg	cgtcatgcgg	tcgctgcgta	tatgatgcga	tgagtaaata	4260
aacaaatacg	caaggggaac	gcatgaaggt	tatcgctgta	cttaaccaga	aaggcgggtc	4320
aggcaagacg	accatcgcaa	cccattctagc	ccgcgccttg	caactcgccg	gggcccgatgt	4380
tctgttagtc	gattccgac	cccagggcag	tgcccgcgat	tgggcggccg	tgccgggaaga	4440
tcaaccgcta	accgttgtcg	gcatcgaccg	cccgcagatt	gaccgcgacg	tgaaggccat	4500
cgccggcgcg	gacttcgtag	tgatcgacgg	agcgcctcag	gcggcggaact	tggctgtgtc	4560
cgcgatcaag	gcagccgact	tcgtgctgat	tccggtgcag	ccaagccctt	acgacatatg	4620
ggccaccgccc	gacctgggtg	agctgggttaa	gcagcgcatt	gaggtcacgg	atggaaggct	4680
acaagcgggc	tttgtcgtgt	cgccggcgat	caaaggcacg	cgcatcgccg	gtgaggttgc	4740
cgagggcgctg	gcccgggtacg	agctgcccac	tcttgagtcc	cgtatcacgc	agcgcggtgag	4800
ctaccagggc	actgccgcgg	ccggcacaac	cgttcttgaa	tcagaacccg	agggcgacgc	4860
tgcccgcgag	gtccaggcgc	tggccgctga	aattaaatca	aaactcattt	gagttaatga	4920
ggtaaaagaa	aaatgagcaa	aagcacaac	acgctaagt	ccggccgtcc	gagcgacgc	4980
agcagcaagg	ctgcaacggt	ggccagcctg	gcagacacgc	cagccatgaa	gcgggtcaac	5040
tttcagtttg	cgccggagga	tcacaccaag	ctgaagatgt	acgcggtacg	ccaaggcaag	5100
accattaccg	agctgctatc	tgaatacatc	gcgcagctac	cagagtaaat	gagcaaatga	5160
ataaatgagt	agatgaattt	tagcggctaa	aggaggcggc	atggaaaatc	aagaacaacc	5220
aggcaccgac	gcccgtggaat	gccccatgtg	tggaggaacg	ggcggttggc	caggcgtaag	5280
cggttgggtt	gtctgccggc	cctgcaattg	cactggaacc	cccaagcccg	aggaatcggc	5340
gtgagcggtc	gcaaaccatc	cgcccccgtg	caaatcggcg	cgccgctggg	tgatgacctg	5400
gtggagaagt	tgaaggccgc	gcaggccgcc	cagcggcaac	gcacgaggc	agaagacgcc	5460
ccggtgaatc	gtggcaaggg	gccgctgac	gaatccgcaa	agaatcccgg	caaccgcccg	5520
cagccggtgc	gcccgtcgatt	aggaagccgc	ccaagggcga	cgagcaacca	gatttttttcg	5580
ttccgatgct	ctatgacgtg	ggcaccgcg	atagtcgcag	catcatggac	gtggccgttt	5640
tccgtctgtc	gaagcgtgac	cgacgagctg	gcgaggtgat	ccgctacgag	cttccagacg	5700
ggcacgtaga	ggttttccgca	gggcccggccg	gcatggccag	tgtgtgggat	tacgacctgg	5760
tactgatggc	ggttttcccat	ctaaccgaat	ccatgaaccg	ataccgggaa	tggaaggag	5820
acaagcccgg	ccgcgtgttc	cgtccacacg	ttgcggacgt	actcaagtcc	tgccggcgag	5880
ccgatggcgg	aaagcagaaa	gacgacctgg	tagaaaacctg	cattcggtta	aacaccacgc	5940
acgttgccat	gcagcgtacg	aagaaggcca	agaacggccg	cctggtgacg	gtatccgagg	6000
gtgaagcctt	gattagccgc	tacaagatcg	taaagagcga	aaccgggagg	ccggagtaca	6060
tcgagatcga	gctagctgat	tggatgtacc	gcgagatcac	agaaggcaag	aaccgggacg	6120
tgctgacggg	tcaccccgat	tactttttga	tcgatcccgg	catcgcccg	tttctctacc	6180
gcctggcacg	ccgcgcgcga	ggcaaggcag	aagccagatg	gttgttcaag	acgatctacg	6240
aacgcagtgg	cagcgcggga	gagttcaaga	agttctgttt	caccgtgcgc	aagctgatcg	6300
ggtcaaatga	cctgccggag	tacgatttga	aggaggaggc	ggggcaggct	ggcccgatcc	6360
tagtcatgcg	ctaccgcaac	ctgatcgagg	gcgaagcatc	cgccggttcc	taatgtacgg	6420
agcagatgct	agggcaaat	gccctagcag	gggaaaaagg	tcgaaaaagg	ctctttctctg	6480
tggatagcac	gtacattggg	aacccaaagc	cgtacattgg	gaaccggaac	ccgtacattg	6540
ggaacccaaa	gccgtacatt	gggaaccggg	cacacatgta	agtgactgat	ataaaaagaga	6600
aaaaaggcga	tttttccgcc	taaaactctt	taaaacttat	taaaactctt	aaaacccgcc	6660
tggcctgtgc	ataactgtct	ggccagcgca	cagccgaaga	gctgcaaaaa	gcgcctaccc	6720
ttcggtcgct	gcgctcccta	cgccccgcgg	cttcgcgctg	gcctatcgcg	gcctatgcgg	6780
tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgctc	ttccgcttcc	6840
tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcggtatc	agctcactca	6900
aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	6960
aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	7020



```

ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg 7080
acaggactat aaagatacca ggcggtttccc cctggaagct cctcgtgctg ctctcctggt 7140
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt 7200
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 7260
tgtgtgcacg aaccccccg tccagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 7320
gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 7380
agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc 7440
tacactagaa ggacagtatt tgggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa 7500
agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt 7560
tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 7620
acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgcatgat 7680
atatctccca atttgtgtag ggcttattat gcacgcttaa aaataataaa agcagacttg 7740
acctgatagt ttggctgtga gcaattatgt gcttagtgca tctaacgctt gagttaagcc 7800
gcgccgcgaa gcggcgctcg cttgaacgaa tttctagcta gacattattt gccgactacc 7860
ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca actgatctgc gcgcgaggcc 7920
aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt caagtatgac gggctgatac 7980
tgggcccggc ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat ccttcggcgc gatcttgccg 8040
gttactgcgc tgtaccaa at gcgggacaac gtaagcacta catttcgctc atcgccagcc 8100
cagtcgggcg gcgagttcca tagcggttaag gtttcattta gcgcctcaa tagatcctgt 8160
tcaggaaccg gatcaaagag ttctccgccc gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct 8220
cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg tggctggctc gaagatacct 8280
gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt cgcgcttagc tggataacgc 8340
cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta cagcgcgag aatctcgctc 8400
tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcggtgatca aagctcgccg cgttgtttca 8460
tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac tgtgtggctt caggccgcca 8520
tccactgcgg agccgtacaa atgtacggc agcaacgtcg gttcgagatg gcgctcgatg 8580
acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga tcaccgcttc ccccatgatg 8640
tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat cgttgctgct ccataacatc 8700
aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggtat cccgaggcat agactgtacc 8760
ccaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgttccatg 8809

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 18

actagtagt ctgctgctgc tgatag

26

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 19

ctcgagatct tcatgtagat ctaatt

26

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 20  
 gcggccgcca tgtctgctgc tgctgatag 29  
 <210> 21  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer  
 <400> 21  
 gcggccgcat cttcatgtag atctaatt 28  
 <210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
 sequence motive  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (8)  
 <223> Thr  
 <400> 22  
 Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys  
 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
 sequence motive  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Gln  
 <400> 23  
 His Glu Gln Asn Val Lys Tyr Leu  
 1 5  
 <210> 24  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
 sequence motive  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Asn  
 <220>  
 <221> VARIANT

<222> (2)

<223> Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)

<223> Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)

<223> Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)

<223> Ile or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)

<223> Leu or Ile

<400> 24

Asp	Ile	Leu	Val	Phe	Val	Leu	Pro	His	Gln	Phe	Val
1					5					10	

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)

<223> Ile

<400> 25

Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly
1				5		

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

```

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)
<223> Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)
<223> Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)
<223> Ile

<400> 26
Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Xaa Glu Val Ala
  1             5             10

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)
<223> Val

<400> 27
Leu Phe Xaa Arg Pro Tyr Phe Xaa Val
  1             5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH
sequence motive

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> Met

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)
<223> Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)
<223> Ile

<220>
<221> VARIANT

```

<222> (6)  
<223> Gln  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> Lys or Asn  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (9)  
<223> Ser or Ala  
  
<400> 28  
Gly Leu Leu Glu Met Ile Arg Phe Gly  
1 5  
  
<210> 29  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (13)  
<223> Ile  
  
<400> 29  
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn  
1 5 10 15  
  
<210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Arg  
  
<400> 30  
Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro  
1 5 10  
  
<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> Val  
<400> 31  
Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu  
1 5 10  
<210> 32  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Val  
<400> 32  
Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu  
1 5 10  
<210> 33  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (11)  
<223> Thr  
<400> 33  
Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala  
1 5 10  
<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<400> 34  
Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val  
1 5  
<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)
<223> Arg
<400> 35
Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly
  1                               5
<210> 36
<211> 13718
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: expression
      vector pGPTV-gpd1
<220>
<221> promoter
<222> (10807)..(11951)
<223> napin promoter
<220>
<221> terminator
<222> (13154)..(13408)
<223> nos terminator
<220>
<221> misc_feature
<222> (11962)..(13137)
<223> coding for yeast G3PDH (gpd1)
<400> 36
gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcag acagcgccag cagaatgcc 120
tagtgggcgg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggccggg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc ggcacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt gggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcatccatg 660
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgga 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgcggggccg gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctc gagcagggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccctt 1080
ccaccgctc agacgcccggt agcagcccg ctagggcttt tcatgccct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200
gtcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcg 1440
aggactataa agataaccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc 1500
gacctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccctctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttgg tgtatccaac 1680

```

ggcgtcagcc	gggcaggata	ggtgaagtag	gcccacccgc	gagcgggtgt	tccttcttca	1740
ctgtccctta	ttcgcacctg	gcggtgctca	acgggaatcc	tgctctgcga	ggctggcccg	1800
ctaccgccgg	cgtaacagat	gagggcaagc	ggatggctga	tgaaccaag	ccaaccagga	1860
agggcagccc	acctatcaag	gtgtactgcc	ttccagacga	acgaagagcg	attgaggaaa	1920
aggcggcggc	ggccggcatg	agcctgtcgg	cctacctgct	ggccgtcggc	cagggtctaca	1980
aaatcacggg	cgtcgtggac	tatgagcacg	tccgcgagct	ggcccgcac	aatggcgacc	2040
tgggcgcctt	gggcccctg	ctgaaactct	ggctcaccga	cgaccgcgc	acggcgcggt	2100
tcggtgatgc	cacgatcctc	gccctgctgg	cgaagatcga	agagaagcag	gacgagcttg	2160
gcaaggtcat	gatgggcgtg	gtccgcccga	gggcagagcc	atgacttttt	tagccgctaa	2220
aacggccggg	gggtgcgcgt	gattgccaa	cacgtcccca	tgcgtccat	caagaagagc	2280
gacttcgcgg	agctggtgaa	gtacatcacc	gacgagcaag	gcaagaccga	gcgcttttgc	2340
gacgtcacc	gggctgggtg	ccctcgccgc	tgggctggcg	gccgtctatg	gccctgcaaa	2400
cgcgccagaa	acgccgtcga	agccgtgtgc	gagacaccgc	ggccgcgggc	gttgtggata	2460
cctcgcggaa	aacttggccc	tactgacag	atgaggggcg	gacgttgaca	cttgaggggc	2520
cgactcacc	ggcgcggcgt	tgacagatga	ggggcaggct	cgatttcggc	cggcgacgtg	2580
gagctggcca	gcctcgcaaa	tcggcgaaaa	cgctgattt	tacgcgagtt	tcccacagat	2640
gatgtggaca	agcctgggga	taagtgcctt	gcggtattga	cacttgaggg	gcgcgactac	2700
tgacagatga	ggggcgcgat	ccttgacact	tgaggggag	agtgtgaca	gatgaggggc	2760
gcacctattg	acatttgagg	ggctgtccac	aggcagaaaa	tccagcattt	gcaagggttt	2820
ccgcccgttt	ttcgccacc	gctaacctgt	cttttaacct	gcttttaaac	caatatttat	2880
aaaccttggt	tttaaccagg	gctgcgccct	gtgcgcgtga	ccgcgcacgc	cgaagggggg	2940
tgccccccct	tctcgaacct	tcccgcccg	ctaaccgggg	cctcccatcc	ccccaggggc	3000
tgcgccctc	ggcgcggaac	ggcctcacc	caaaaatggc	agcgtggca	gtccttgcca	3060
ttgcgggat	cggggcagta	acgggatggg	cgatcagccc	gagcgcgacg	cccgggaagca	3120
ttgacgtgcc	gcaggtgctg	gcacgcacat	tcagcgacca	ggtgcggggc	agtgagggcg	3180
gcggcctggg	tggcgccctg	cccttcactt	cggccgtcgg	ggcattcacg	gacttcatgg	3240
cggggccggc	aattttttacc	ttgggcattc	ttggcatagt	ggtcgcgggt	gccgtgctcg	3300
tgttcggggg	tgcgataaac	ccagcgaacc	atttgagggtg	ataggtaaga	ttataccgag	3360
gtatgaaaac	gagaattgga	cctttacaga	attactctat	gaagcgccat	atttaaaaag	3420
ctaccaagac	gaagaggatg	aagaggatga	ggaggcagat	tgcttgaat	atattgacaa	3480
tactgataag	ataatatatc	ttttatatag	aagatatcgc	cgtatgtaag	gatttcaggg	3540
ggcaaggcat	aggcagcgcg	cttatcaata	tatctataga	atgggcaaa	cataaaaact	3600
tgcatggact	aatgcttgaa	accaggaca	ataaccttat	agcttgtaaa	ttctatcata	3660
attgggtaat	gactccaact	tattgatagt	gttttatgtt	cagataatgc	ccgatgactt	3720
tgatcatgcg	ctccaccgat	tttgagaacg	acagcgactt	ccgtcccagc	cgtgccagggt	3780
gctgcctcag	attcagggtta	tgccgctcaa	ttcgctgcgt	atatcgcttg	ctgattacgt	3840
gcagctttcc	cttcaggcg	gattcataca	gcgccagcc	atccgtcatc	catatcacca	3900
cgtcaaagg	tgacagcagg	ctcataagac	gccccagcgt	cgccatagt	cgttcaccga	3960
atacgtgcgc	aacaaccgtc	ttccggagac	tgatcatcgc	gtaaaacagc	cagcgtggc	4020
gcgatttagc	cccagacatag	ccccactgtt	cgtccatttc	cgcgagacg	atgacgtcac	4080
tgccggctg	tatgcgcgag	gttaccgact	gcgccctgag	ttttttaagt	gacgtaaaat	4140
cgtgttgagg	ccaacgcca	taatgcgggc	tggtgcccgg	catccaacgc	cattcatggc	4200
catatcaatg	attttctggt	gcgtaccggg	ttgagaagcg	gtgtaagtga	actgcagttg	4260
ccatgtttta	cggcagtgag	agcagagata	gcgtgatgt	ccggcgggtg	ttttgccgtt	4320
acgcaccacc	ccgtcagtag	ctgaacagga	gggacagctg	atagacacag	aagccactgg	4380
agcacctcaa	aaacaccatc	ataactaaa	tcagtaagtt	ggcagcatca	cccataattg	4440
tggtttcaaa	atcggtccg	tcgatactat	gttatacgcc	aactttgaaa	acaactttga	4500
aaaagctggt	ttctggtatt	taaggtttta	gaatgcaagg	aacagtgaat	tggagtctgt	4560
cttggtataa	ttagcttctt	ggggtatctt	taaatactgt	agaaaagagg	aaggaaataa	4620
taaatggcta	aaatgagaat	atcaccggaa	ttgaaaaaac	tgatcgaaaa	ataccgctgc	4680
gtaaaagata	cggaagggaat	gtctcctgct	aaggatata	agctggtggg	agaaaaatgaa	4740
aacctatatt	taaaaatgac	ggacagccgg	tataaaggga	ccacctatga	tgtggaacgg	4800
gaaaaggaca	tgatgctatg	gctggaagg	aagctgcctg	ttccaaagg	cctgactttt	4860
gaacggcatg	atggctggag	caatctgctc	atgagtgagg	ccgatggcgt	cctttgctcg	4920
gaagagtatg	aagatgaaca	aagccctgaa	aagattatcg	agctgtatgc	ggagtgcac	4980
aggctctttc	actccatcga	catatcggat	tgtccctata	cgaatagctt	agacagccgc	5040
ttagccgaat	tggattactt	actgaataac	gatctggccg	atgtggattg	cgaaaactgg	5100



gaagaagaca	ctccatttaa	agatccgcgc	gagctgtatg	atttttttaa	gacggaaaag	5160
cccgaagagg	aacttgtctt	ttcccacggc	gacctgggag	acagcaacat	ctttgtgaaa	5220
gatggcaaaag	taagtggcct	tattgatctt	gggagaagcg	gcagggcgga	caagtgggat	5280
gacattgcct	tctgcgtccg	gtcgatcagg	gaggatatcg	gggaagaaca	gtatgtcgag	5340
ctattttttg	acttactggg	gatcaagcct	gattggggaga	aaataaaaata	ttatatattta	5400
ctggatgaat	tgttttagta	cctagatgtg	gcgcaacgat	gccggcgaca	agcaggagcg	5460
caccgacttc	ttccgcatca	agtgttttgg	ctctcaggcc	gaggcccacg	gcaagtattt	5520
gggcaagggg	tcgctgggat	tcgtgcaggg	caagattcgg	aataccaagt	acgagaagga	5580
cggccagacg	gtctacggga	cgcacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacaccaa	5640
ggcaccaggc	gggtcaaata	aggaataaag	gcacattgcc	cgggctgag	tcggggcaat	5700
cccgaagga	gggtgaatga	atcggacgtt	tgaccggaag	gcatacaggc	aagaactgat	5760
cgacgcgggg	ttttccgccc	aggatgccga	aaccatcgca	agccgcaccg	tcatgcgtgc	5820
gccccgcgaa	accttccagt	ccgtcggctc	gatggtccag	caagctacgg	ccaagatcga	5880
gcgcgacagc	gtgcaactgg	ctccccctgc	cctgcccgcg	ccatcggccg	ccgtggagcg	5940
ttcgcgtcgt	ctcgaacagg	aggcggcagg	tttggcgaag	tcgatgacca	tcgacacgcg	6000
aggaactatg	acgaccaaga	agcgaaaaac	cgccggcgag	gacctggcaa	aacagggtcag	6060
cgaggccaag	caggcccgct	tgctgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aaatgcagct	6120
ttccttgttc	gatattgcgc	cgtggccgga	cacgatgcga	gcgatgcaa	acgacacggc	6180
ccgctctgcc	ctgttcacca	cgcgcaacaa	gaaaatcccg	cgcgaggcgc	tgcaaaaaca	6240
ggtcattttc	cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgtcg	agctgcgggc	6300
cgacgatgac	gaactggtgt	ggcagcaggt	gttgagtagc	gcgaagcgca	cccctatcgg	6360
cgagccgatc	accttcacgt	tctacgagct	ttgccaggac	ctgggctggt	cgatcaatgg	6420
ccggtattac	acgaaggccg	aggaatgcct	gtcgcgccta	caggcgacgg	cgtgggctt	6480
cacgtccgac	cgcggtgggc	acctggaatc	ggtgtcgtcg	ctgcaccgct	tcgcgctcct	6540
ggaccgtggc	aagaaaacgt	cccgttgcca	ggtcctgatc	gacgaggaaa	tcgtcgtgct	6600
gtttgtctgg	gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tgctcggcgc	6660
ggcccgacgg	atgttcgact	atttcagctc	gcaccgggag	ccgtaccgcg	tcaagctgga	6720
aaccttccgc	ctcatgtgcg	gatcggatc	caccgcgctg	aagaagtggc	gcgagcaggt	6780
cggcgaagcc	tgcaagagt	tgcgaggcag	cggcctgggt	gaacacgcct	gggtcaatga	6840
tgacctggtg	cattgcaaac	gctagggcct	tgtgggggtc	gttccggctg	ggggttcagc	6900
agccagcgct	ttactggcat	ttcaggaaca	agcgggcact	gctcgacgca	cttgcttcgc	6960
tcagtatcgc	tcgggacgca	cggcgcgtc	tacgaactgc	cgataaacag	aggattaaaa	7020
ttgacaattg	tgattaaggc	tcagattcga	cggcttgagg	cggccgacgt	gcaggatttc	7080
cgcgagatcc	gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tggtcgggtc	cgtttacgag	7140
caagaggaga	aaaagcccat	ggaggcggtc	gctgaacggg	tgcgagatgc	cgtggcattc	7200
ggcgccctaca	tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcgggtc	tcaaacagga	ggacggcccc	7260
aaggacgctc	acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agcccgaaca	gcgaggccga	7320
ggggctgcgg	gtatgctgct	gcgggcgttg	ccggcggttg	tattgctcgt	gatgatcgtc	7380
cgacagattc	caacgggaat	ctgggtgatg	cgcatcttca	tcctcggcgc	acttaatat	7440
tcgctattct	ggagcttggt	gtttatttct	gtctaccgcc	tgccggggcg	ggtcgcggcg	7500
acggtaggcg	ctgtgcagcc	gctgatggtc	gtgttcatct	ctgccgctct	gctaggtagc	7560
ccgatacgat	tgatggcggg	cctgggggct	atttgcgga	ctgcgggcgt	ggcgctgttg	7620
gtgttgacac	caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgctg	cagcgggcct	ggcgggggag	7680
gtttccatgg	cgttcggaac	cgtgctgacc	cgcaagtggc	aacctcccgt	gcctctgctc	7740
acctttaccg	cctggcaact	ggcgggccga	ggacttctgc	tcgttccagt	agcttttagtg	7800
tttgatccgc	caatcccgat	gcctacagga	accaatgttc	tcggcctggc	gtggctcggc	7860
ctgatcggag	cgggtttaac	ctacttcctt	tgggtccggg	ggatctcgcg	actcgaacct	7920
acagttgttt	ccttactggg	ctttctcagc	cccagatctg	gggtcgtatc	gccgggggatg	7980
catcaggccg	acagtcggaa	cttcgggtcc	ccgacctgta	ccattcgggtg	agcaatggat	8040
aggggagttg	atatcgtcaa	cgttcacttc	taaagaaata	gcgccactca	gcttctctcag	8100
cggctttatc	cagcgatttc	ctattatgtc	ggcatagtgc	tcaagatcga	cagcctgtca	8160
cggtaagcg	agaaatgaat	aagaaggctg	ataattcgga	tctctgcgag	ggagatgata	8220
tttgatcaca	ggcagcaacg	ctctgtcacc	gttacaatca	acatgctacc	ctccgcgaga	8280
tcacccgtgt	ttcaaaccgc	gcagcttagt	tgccgttctt	ccgaatagca	tcggtaacat	8340
gagcaaagtc	tgccgcctta	caacggctct	cccgtgacg	ccgtcccggg	ctgatgggct	8400
gcctgtatcg	agtgggtgatt	ttgtgccgag	ctgccggctg	gggagctgtt	ggctgggctgg	8460
tggcaggata	tattgtgggtg	taaacaaatt	gacgcttaga	caacttaata	acacattgcg	8520

gacgttttta	atgtactggg	gtgggtttttc	ttttcaccag	tgagacgggc	aacagctgat	8580
tgcccttcac	cgccctggccc	tgagagagtt	gcagcaagcg	gtccacgctg	gtttgccccca	8640
gcaggcgaaa	atcctgtttg	atgggtggttc	cgaaatcggc	aaaatccctt	ataaatcaaa	8700
agaatagccc	gagatagggg	tgagtgttgt	tccagtttgg	aacaagagtc	cactattaaa	8760
gaacgtggac	tccaacgtca	aagggcgaaa	aaccgtctat	cagggcgatg	gcccactacg	8820
tgaaccatca	cccaaataca	gttttttggg	gtcagaggtg	cgtaaagcac	taaatcggaa	8880
ccctaaaggg	agcccccgat	ttagagcttg	acggggaaag	ccggcgaacg	tggcgagaaa	8940
ggaagggaag	aaagcgaaa	gagcggggcg	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	9000
gatcgggtgc	ggcctcttcg	ctattacgcc	agctggcgaa	agggggatgt	gctgcaaggc	9060
gattaagtgt	ggtaacgcca	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtgt	9120
aattaattcc	catcttgaaa	gaaatatagt	ttaaataatt	attgataaaa	taacaagtca	9180
ggtattatag	tccaagcaaa	aacataaatt	tattgatgca	agtttaaatt	cagaaatatt	9240
tcaataactg	attatatcag	ctggtacatt	gccgtagatg	aaagactgag	tgcgatatta	9300
tgtgtaatac	ataaattgat	gatatagcta	gcttagctca	tcgggggatc	cgtcgaagct	9360
agcttgggtc	ccgctcagaa	gaactcgtca	agaaggcgat	agaaggcgat	gcgctgcgaa	9420
tcggggagcgg	cgataccgta	aagcacgagg	aagcggtcag	cccattcgcg	gccaaagctct	9480
tcagcaatat	cacgggtagc	caacgctatg	tcctgatagc	gggccgccac	accagccggg	9540
ccacagtcga	tgaatccaga	aaagcggcca	ttttccacca	tgatattcgg	caagcaggca	9600
tcgccatggg	tcacgacgag	atcctcgccg	tcgggcatgc	gcgccttgag	cctggcgaaac	9660
agttcggctg	gcgcgagccc	ctgatgctct	tcgtccagat	catcctgatc	gacaagaccg	9720
gcttccatcc	gagtacgtgc	tcgctcgatg	cgatgtttcg	cttggtgggtc	gaatgggcag	9780
gtagccggat	caagcgtatg	cagccgcgcg	attgcatcag	ccatgatgga	tactttctcg	9840
gcaggagcaa	ggtgagatga	caggagatcc	tgccccggca	cttcgcccaa	tagcagccag	9900
tcctttcccc	cttcagtgc	aacgtcgagc	acagctgcgc	aaggaacgcc	cgtcgtgggc	9960
agccacgata	gcccgcgtgc	ctcgtcctgc	agttcattca	gggcaccgga	caggctcgggtc	10020
ttgacaaaaa	gaaccgggcg	cccctgcgct	gacagccgga	acacggcggc	atcagcagag	10080
ccgattgtct	gttgtgcccc	gtcatagccg	aatagcctct	ccaccaagc	ggccggagaa	10140
cctgcgtgca	atccatcttg	ttcaatccaa	gctcccatgg	gccctcgact	agagtcgaga	10200
tctggattga	gagtgaatat	gagactctaa	ttggataccg	aggggaattt	atggaacgtc	10260
agtggagcat	ttttgacaag	aaatatattgc	tagctgatag	tgaccttagg	cgacttttga	10320
acgcgcaata	atgggtttctg	acgtatgtgc	ttagctcatt	aaactccaga	aaccgcgggc	10380
tgagtggctc	cttcaacggt	gcggttctgt	cagttccaaa	cgtaaaacgg	cttgtccccg	10440
gtcatcggcg	ggggtcataa	cgtgactccc	ttaattctcc	gctcatgatc	ttgatccctt	10500
gcgccatcag	atccttggcg	gcaagaaagc	catccagttt	actttgcagg	gcttcccaac	10560
cttaccagag	ggcgccccag	ctggcaattc	cggttcgctt	gctgtccata	aaaccgcccc	10620
gtctagctat	cgccatgtaa	gcccactgca	agctacctgc	tttctctttg	cgcttgcggt	10680
ttcccttgte	cagatagccc	agtagctgac	attcatccgg	ggtcagcacc	gtttctgcgg	10740
actggctttc	tacgtgttcc	gcttccttta	gcagcccttg	cgccctgagt	gcttgcgcca	10800
gcgtgaagct	ttcttcatcg	gtgattgatt	cctttaaaga	cttatgtttc	ttatcttgct	10860
tctgaggcaa	gtattcagtt	accagttacc	acttatattc	tggactttct	gactgcatcc	10920
tcatttttcc	aacattttaa	atttcactat	tggctgaatg	cttcttcttt	gaggaagaaa	10980
caattcagat	ggcagaaatg	tatcaaccaa	tgcatatata	caaagtacc	tcttgttctc	11040
aaaacatcta	tcggatgggt	ccatttgctt	tgcatccaa	ttagtgacta	ctttatatta	11100
ttcactcctc	tttattacta	ttttcatgcg	aggttgccat	gtacattata	tttgtaagga	11160
ttgacgctat	tgagcgtttt	tcttcaattt	tctttatttt	agacatgggt	atgaaatgtg	11220
tgttagagtt	gggttgaatg	agatatacgt	tcaagtgaat	ggcataccgt	tctcgagtaa	11280
ggatgacctc	cccattcttg	agacaaatgt	tacattttag	tatcagagta	aaatgtgtac	11340
ctataactca	aattcgattg	acatgtatcc	attcaacata	aaattaaacc	agcctgcacc	11400
tgcatccaca	tttcaagtat	tttcaaaccg	ttcggctcct	atccaccggg	tgtaacaaga	11460
cggattccga	atttggaaga	ttttgactca	aattcccaat	ttatattgac	cgtgactaaa	11520
tcaactttaa	cttctataat	tctgattaag	ctcccaattt	atattcccaa	cggcactacc	11580
tccaaaattt	atagactctc	atcccctttt	aaaccaactt	agtaaacggt	ttttttttta	11640
attttatgaa	gttaagtgtt	taccttggtt	ttaaaaagaa	tcgttcataa	gatgccatgc	11700
cagaacatta	gctacacggt	acacatagca	tgacgcccgc	gagaattgtt	tttcttcgcc	11760
acttgctact	cccttcaaac	acctaagagc	ttctctctca	cagcacacac	atacaatcac	11820
atgcgtgcac	gcattattac	acgtgatcgc	catgcaaata	tcctttatag	cctataaatt	11880
aactcatccg	cttcaactct	tactcaaacc	aaaactcatc	aatacaaaaa	agattaaaaa	11940

```

catacacgag gatccactag tatgtctgct gctgctgata gattaaactt aacttccggc 12000
cacttgaatg ctggtagaaa gagaagttcc tcttctgttt ctttgaaggc tgccgaaaag 12060
cctttcaagg ttactgtgat tggatctggt aactggggta ctactattgc caagggtggtt 12120
gccgaaaatt gtaagggaata cccagaagtt ttcgctccaa tagtacaaat gtgggtgttc 12180
gaagaagaga tcaatgggtga aaaattgact gaaatcataa atactagaca tcaaaacgtg 12240
aaatacttgc ctggcatcac tctacccgac aatttggttg ctaatccaga cttgattgat 12300
tcagtcaagg atgtcgacat catcgcttcc aacattccac atcaattttt gccccgtatc 12360
tgtagccaat tgaaagggtca tgttgattca cacgtcagag ctatctcctg tctaaagggg 12420
tttgaagttg gtgctaaagg tgtccaattg ctatcctctt acatcactga ggaactagggt 12480
attcaatgtg gtgctctatc tgggtgctaac attgccactg aagtcgctca agaactctgg 12540
tctgaaacaa cagttgctta ccacattcca aaggatttca gaggcgaggg caaggacgtc 12600
gaccataagg ttctaaaggc cttgttccac agaccttact tccacgttag tgtcatcgaa 12660
gatgttgctg gtatctccat ctgtggtgct ttgaagaacg ttgttgccct aggttgtgtg 12720
ttcgtcgaag gtctaggctg gggtaacaac gcttctgctg ccatccaaag agtcggtttg 12780
ggtgagatca tcagattcgg tcaaatgttt tcccagaat ctagagaaga aacatactac 12840
caagagtctg ctggtgttgc tgatttgatc accacctgcg ctggtggtag aaacgtcaag 12900
gttgctaggc taatggctac ttctggtaag gacgcctggg aatgtgaaaa ggagttgttg 12960
aatggccaat ccgctcaagg tttaattacc tgcaaagaag ttcacgaatg gttggaaaca 13020
tgtggctctg tcgaagactt cccattattt gaagccgtat accaaatcgt ttacaacaac 13080
tacccaatga agaacctgcc ggacatgatt gaagaattag atctacatga agattagctc 13140
gacgaatttc cccgatcggt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 13200
tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 13260
taacatgtaa tgcgatgact tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcgaatt 13320
atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 13380
cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attcagatcg gctgagtggc tccttcaacg 13440
ttgcgntct gtcagtncca aacgtaaaac ggggttggtc gcggnatcgg gcggggggcc 13500
ttaaccgtgn actnccntna ttntcccgcc ttcantgnnn agaattggnc ntttccccgn 13560
cntcagttta aactatcagg tgtttgacag gatataattg gcgggtaaac ctaaganaaa 13620
agagcgttta ttagaataat cggatattta aaagggccgn gaaaagggtt atcccttccg 13680
tccatttgta tgnngcatgcc naccaccagg gttcccca 13718

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 1254

&lt;212&gt; DNA

<213> *Emericella nidulans*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1251)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 37

```

atg ggc tct ctt gga ccg tat aag caa aag cac aag gtg act gtg gtg 48
Met Gly Ser Leu Gly Pro Tyr Lys Gln Lys His Lys Val Thr Val Val
  1             5             10             15

gga tcg ggt aac tgg ggc acc gct ata gcc aaa atc gtc gcc gag aat 96
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Val Ala Glu Asn
          20             25             30

act gcc agc aac cct gcg gtc ttt gag aag gat gtt cag atg tgg gtt 144
Thr Ala Ser Asn Pro Ala Val Phe Glu Lys Asp Val Gln Met Trp Val
          35             40             45

ttc gag gaa aag gtc gag att ccg aaa tcg tcg aag cat tat gat cct 192
Phe Glu Glu Lys Val Glu Ile Pro Lys Ser Ser Lys His Tyr Asp Pro
          50             55             60

gcc tct tct ctt tgc cag ggc ccg cag aat ctg aca gat att atc aac 240
Ala Ser Ser Leu Cys Gln Gly Pro Gln Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn
          65             70             75             80

```

cat acc cat gag aat atc aag tac ctc ccc gga att acc ctt ccg gaa	288
His Thr His Glu Asn Ile Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Thr Leu Pro Glu	
85 90 95	
aac ttg att gcc aat cca tcg cta gtc gac gcg gtt caa gac agc act	336
Asn Leu Ile Ala Asn Pro Ser Leu Val Asp Ala Val Gln Asp Ser Thr	
100 105 110	
atc ctc gtc ttc aac cta ccc cat caa ttc atc atc aat att tgt gaa	384
Ile Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Ile Ile Asn Ile Cys Glu	
115 120 125	
cag atc aag ggc aag att gtc cca tac gcg cgt gga att tct tgc ata	432
Gln Ile Lys Gly Lys Ile Val Pro Tyr Ala Arg Gly Ile Ser Cys Ile	
130 135 140	
aag ggc gtg gat gtg aat gag gaa gga gtc cac ctg ttt tcc gaa aca	480
Lys Gly Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Val His Leu Phe Ser Glu Thr	
145 150 155 160	
att gga aag att ctc ggg atc tac tgt ggc gcc ctg tcc ggt gcc aac	528
Ile Gly Lys Ile Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn	
165 170 175	
atc gcg aat gag gtc gcc cag gaa aag tgg tcc gag tct agc att ggt	576
Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln Glu Lys Trp Ser Glu Ser Ser Ile Gly	
180 185 190	
tat gat cca ccg cat ttt gac tct aaa gcc cct tct cct ccc aac cga	624
Tyr Asp Pro Pro His Phe Asp Ser Lys Ala Pro Ser Pro Pro Asn Arg	
195 200 205	
tcc cct tcc gca tcg act gac aat atc ctg cac ttc gag cac aaa gac	672
Ser Pro Ser Ala Ser Thr Asp Asn Ile Leu His Phe Glu His Lys Asp	
210 215 220	
gtt tcg ggt caa ctt tcg cgg gta aag cta cag gct cta cct tcc gaa	720
Val Ser Gly Gln Leu Ser Arg Val Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Glu	
225 230 235 240	
ttt cct ccc atc gac cat gcc ctt ctc aag tcg cta ttc cac cgt cct	768
Phe Pro Pro Ile Asp His Ala Leu Leu Lys Ser Leu Phe His Arg Pro	
245 250 255	
tac ttc cat att ggt gtg gta agt gac gtc gca ggt gtt tcg tta gga	816
Tyr Phe His Ile Gly Val Val Ser Asp Val Ala Gly Val Ser Leu Gly	
260 265 270	
ggt gcc ctt aag aat gtc gtt gct gtc gcg gca ggg tgg gtt gtg ggc	864
Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Val Ala Ala Gly Trp Val Val Gly	
275 280 285	
aaa gga tgg gga gac aat gcg aag gct gca att atg cga gtt ggg ctt	912
Lys Gly Trp Gly Asp Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Val Gly Leu	
290 295 300	
ttg gaa atg gtg aag ttc ggc gaa cag ttt ttc ggt gct acc atc aac	960
Leu Glu Met Val Lys Phe Gly Glu Gln Phe Phe Gly Ala Thr Ile Asn	
305 310 315 320	
act cgc acc ttc act gaa gaa agt gct ggt gtt gcc gat cta atc acg	1008
Thr Arg Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr	
325 330 335	
agt tgc agt ggc gga cga aac ttc cgc tgc gca aag ctt agc att gaa	1056
Ser Cys Ser Gly Gly Arg Asn Phe Arg Cys Ala Lys Leu Ser Ile Glu	
340 345 350	

aga aac cag ccg att gag aaa atc gag gag aca gag ttg aac ggc cag 1104  
 Arg Asn Gln Pro Ile Glu Lys Ile Glu Glu Thr Glu Leu Asn Gly Gln  
 355 360 365

aag ctg caa ggc act ttg act gca gtc gaa gtc aac agt ttc ttg aaa 1152  
 Lys Leu Gln Gly Thr Leu Thr Ala Val Glu Val Asn Ser Phe Leu Lys  
 370 375 380

aag caa ggt tta gaa gaa gag ttc cca ttg ttt act gca gtc tac cga 1200  
 Lys Gln Gly Leu Glu Glu Glu Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr Arg  
 385 390 395 400

gtt ctt caa ggc acc atg tct gtg gac gag att cct tct ttc att gag 1248  
 Val Leu Gln Gly Thr Met Ser Val Asp Glu Ile Pro Ser Phe Ile Glu  
 405 410 415

cgg taa 1254  
 Arg

<210> 38  
 <211> 417  
 <212> PRT  
 <213> Emericella nidulans

<400> 38  
 Met Gly Ser Leu Gly Pro Tyr Lys Gln Lys His Lys Val Thr Val Val  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Val Ala Glu Asn  
 20 25 30  
 Thr Ala Ser Asn Pro Ala Val Phe Glu Lys Asp Val Gln Met Trp Val  
 35 40 45  
 Phe Glu Glu Lys Val Glu Ile Pro Lys Ser Ser Lys His Tyr Asp Pro  
 50 55 60  
 Ala Ser Ser Leu Cys Gln Gly Pro Gln Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn  
 65 70 75 80  
 His Thr His Glu Asn Ile Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Thr Leu Pro Glu  
 85 90 95  
 Asn Leu Ile Ala Asn Pro Ser Leu Val Asp Ala Val Gln Asp Ser Thr  
 100 105 110  
 Ile Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Ile Ile Asn Ile Cys Glu  
 115 120 125  
 Gln Ile Lys Gly Lys Ile Val Pro Tyr Ala Arg Gly Ile Ser Cys Ile  
 130 135 140  
 Lys Gly Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Val His Leu Phe Ser Glu Thr  
 145 150 155 160  
 Ile Gly Lys Ile Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn  
 165 170 175  
 Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln Glu Lys Trp Ser Glu Ser Ser Ile Gly  
 180 185 190  
 Tyr Asp Pro Pro His Phe Asp Ser Lys Ala Pro Ser Pro Pro Asn Arg  
 195 200 205  
 Ser Pro Ser Ala Ser Thr Asp Asn Ile Leu His Phe Glu His Lys Asp  
 210 215 220  
 Val Ser Gly Gln Leu Ser Arg Val Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Glu  
 225 230 235 240

[illegible]

```
<210> 39
<211> 999
<212> DNA
<213> Debaryomyces hansenii
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(996)
<223> coding for G3PDH (partial)
```

<400> 39																
gga	tct	ggt	aac	tgg	ggt	act	gct	gtt	gct	aag	atc	gta	tct	gaa	aac	48
Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Lys	Ile	Val	Ser	Glu	Asn	
1				5					10					15		
acg	gct	gaa	aaa	cca	gaa	gtg	ttc	gaa	aag	caa	gtg	aac	atg	tgg	gtt	96
Thr	Ala	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	Gln	Val	Asn	Met	Trp	Val	
			20					25					30			
ttt	gaa	gaa	gaa	gtt	gac	gga	caa	aag	ttg	act	gaa	atc	atc	aac	gcc	144
Phe	Glu	Glu	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Asn	Ala	
		35				40						45				
aaa	cac	gaa	aac	gtt	aag	tac	ttg	cca	gaa	gtc	aag	ttg	ccg	gaa	aac	192
Lys	His	Glu	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	Pro	Glu	Val	Lys	Leu	Pro	Glu	Asn	
	50					55					60					
ttg	gtt	gca	aac	cca	gac	gtt	gtt	gac	act	gtc	aag	gat	gca	gac	tta	240
Leu	Val	Ala	Asn	Pro	Asp	Val	Val	Asp	Thr	Val	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu	
65					70					75					80	

39

tta att ttt aac att cca cat caa ttc tta cca aga gtg tgt aag caa	288
Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Val Cys Lys Gln	
85 90 95	
ttg gtt ggc cat gtc aag cca tct gcc aga gcc atc tcc tgt ttg aag	336
Leu Val Gly His Val Lys Pro Ser Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys	
100 105 110	
ggg ttg gaa gtt ggc cca gaa ggt tgt aag ttg tta tcg caa tct atc	384
Gly Leu Glu Val Gly Pro Glu Gly Cys Lys Leu Leu Ser Gln Ser Ile	
115 120 125	
aac gat act tta ggt gtc cac tgt ggt gtc tta tct ggt gcc aac att	432
Asn Asp Thr Leu Gly Val His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Ile	
130 135 140	
gcc aac gaa gtt gcc aga gaa aga tgg tct gaa acc acc att gcc tac	480
Ala Asn Glu Val Ala Arg Glu Arg Trp Ser Glu Thr Thr Ile Ala Tyr	
145 150 155 160	
aac att cca gaa gat ttc aga ggt aag ggt aga gat atc gac gaa tac	528
Asn Ile Pro Glu Asp Phe Arg Gly Lys Gly Arg Asp Ile Asp Glu Tyr	
165 170 175	
gtc tta aag caa tta ttc cac aga acc tac ttc cat gtc aga gtc atc	576
Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Thr Tyr Phe His Val Arg Val Ile	
180 185 190	
aac gac atc ata ggt gct tct ttc gct ggt gct ttg aag aat gtt gtt	624
Asn Asp Ile Ile Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val	
195 200 205	
gcc tgt gct gtt ggt ttc gtt atc ggt gcc ggc tgg ggt gac aac gct	672
Ala Cys Ala Val Gly Phe Val Ile Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Ala	
210 215 220	
aag gcc gct atc atg aga atc ggt atc aga gaa atc atc cac ttt gcc	720
Lys Ala Ala Ile Met Arg Ile Gly Ile Arg Glu Ile Ile His Phe Ala	
225 230 235 240	
tct tac tac caa aag ttc ggt gtc aag ggt cca gct cca gaa tcc act	768
Ser Tyr Tyr Gln Lys Phe Gly Val Lys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Thr	
245 250 255	
act ttc act gag gaa tct gcc ggt gtc gct gac tta atc acc act tgt	816
Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys	
260 265 270	
tcc ggt ggt aga aat gtc aag gtt gct aga tac atg att gaa aac aac	864
Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Tyr Met Ile Glu Asn Asn	
275 280 285	
gtt gac gct tgg gaa gcc gaa aag att gtc tta aag ggt caa tct tct	912
Val Asp Ala Trp Glu Ala Glu Lys Ile Val Leu Lys Gly Gln Ser Ser	
290 295 300	
caa ggt atc tta act gcc aag gaa gtc cac gaa ttg tta act aac tac	960
Gln Gly Ile Leu Thr Ala Lys Glu Val His Glu Leu Leu Thr Asn Tyr	
305 310 315 320	
aac tta tcg aat gaa ttc cca tta ttt gaa gcc gta tac	999
Asn Leu Ser Asn Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val	
325 330	

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Debaryomyces hansenii

&lt;400&gt; 40

Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Val Ala Lys Ile Val Ser Glu Asn  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Glu Lys Pro Glu Val Phe Glu Lys Gln Val Asn Met Trp Val  
 20 25 30  
 Phe Glu Glu Glu Val Asp Gly Gln Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Ala  
 35 40 45  
 Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Glu Val Lys Leu Pro Glu Asn  
 50 55 60  
 Leu Val Ala Asn Pro Asp Val Val Asp Thr Val Lys Asp Ala Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Val Cys Lys Gln  
 85 90 95  
 Leu Val Gly His Val Lys Pro Ser Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys  
 100 105 110  
 Gly Leu Glu Val Gly Pro Glu Gly Cys Lys Leu Leu Ser Gln Ser Ile  
 115 120 125  
 Asn Asp Thr Leu Gly Val His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Ile  
 130 135 140  
 Ala Asn Glu Val Ala Arg Glu Arg Trp Ser Glu Thr Thr Ile Ala Tyr  
 145 150 155 160  
 Asn Ile Pro Glu Asp Phe Arg Gly Lys Gly Arg Asp Ile Asp Glu Tyr  
 165 170 175  
 Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Thr Tyr Phe His Val Arg Val Ile  
 180 185 190  
 Asn Asp Ile Ile Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val  
 195 200 205  
 Ala Cys Ala Val Gly Phe Val Ile Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Ala  
 210 215 220  
 Lys Ala Ala Ile Met Arg Ile Gly Ile Arg Glu Ile Ile His Phe Ala  
 225 230 235 240  
 Ser Tyr Tyr Gln Lys Phe Gly Val Lys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Thr  
 245 250 255  
 Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys  
 260 265 270  
 Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Tyr Met Ile Glu Asn Asn  
 275 280 285  
 Val Asp Ala Trp Glu Ala Glu Lys Ile Val Leu Lys Gly Gln Ser Ser  
 290 295 300  
 Gln Gly Ile Leu Thr Ala Lys Glu Val His Glu Leu Leu Thr Asn Tyr  
 305 310 315 320  
 Asn Leu Ser Asn Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val  
 325 330